

Aus dem Adolf-Butenandt-Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl: Molekularbiologie

Vorstand:
Prof. Dr. P. B. Becker

Thema:
Untersuchungen zur Wechselbeziehung von Struktur und
Funktion von Transkriptionsaktivatoren am *PHO5*-Promotor in
Saccharomyces cerevisiae

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Roman Kischel
aus München

2003

Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. W. Hörz

Mitberichterstatter:

Priv. Doz. Dr. St. Linder

Priv. Doz. Dr. R. Wienecke

Prof. Dr. M. Schleicher

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung:

13.11.2003

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Ergebnisse	11
2.1 Deletionsmutanten von Pho4 und ihre Aktivität am <i>PHO5</i> -Promotor	11
2.1.1 Experimentelle Strategie und Zielsetzung	11
2.1.2 Gezielte Mutagenese des <i>PHO4</i> -Gens mittels der Megaprimer Methode	11
2.1.3 Amplifikation und Verifikation der <i>PHO4</i> -Derivate	16
2.1.4 Transformation der <i>PHO4</i> -Deletionskonstrukte in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
2.1.5 Untersuchung der Aktivität der Pho4-Derivate durch Messung der Phosphataseaktivität	23
2.2 Chimäre GAF-Pho4 Moleküle und ihre Aktivität am <i>PHO5</i> -Promotor	26
2.2.1 Experimentelle Strategie und Zielsetzung	26
2.2.2 Modifikation der <i>GAF</i> -Sequenz mittels der Polymerasekettenreaktion.....	29
2.2.3 Klonierung und Sequenzierung der modifizierten <i>GAF</i> -Sequenz	29
2.2.4 Einbau der <i>GAF</i> -Sequenzen in die Plasmide pP4-12 und pP4-72.....	37
2.2.5 Transformation der <i>GAF-PHO4</i> Konstrukte in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
2.2.6 Nachweis von Plasmid-DNA in Transformanten mittels Southern-Blot.....	47
2.2.7 Bestimmung der Aktivität der chimären Proteine durch Messung der Phosphataseaktivität.....	52
2.2.8 Untersuchung des Effekts der chimären Proteine auf die Chromatinstruktur am <i>PHO5</i> -Promotor durch die Spaltung des Chromatins mit ClaI	54
2.2.9 Untersuchung der Veränderung der Chromatinstruktur durch die chimären Proteine mittels DNaseI-Spaltung	57

3. Diskussion.....	62
3.1 Definition der transaktivierenden Domäne durch Deletionsmutanten von <i>PHO4</i>	62
3.2 Chimäre GAF-Konstrukte am <i>PHO5</i> -Promotor.....	69
4. Material und Methoden.....	77
4.1 DNA	77
4.2 Oligonukleotide	77
4.3 Enzyme	77
4.4 Chemikalien.....	78
4.5 Andere Materialien.....	79
4.6 Kulturmedium für <i>E. coli</i>	79
4.7 Kulturmedien für <i>S. cerevisiae</i>	79
4.8 Bakterienstamm.....	80
4.9 Hefestämme.....	80
4.10 Molekulare Klonierung von DNA.....	80
4.11 Kompetenzinduktion von <i>E. coli</i> -Bakterien	80
4.12 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	81
4.13 Plasmidpräparation.....	81
4.14 DNA-Sequenzierung	81
4.15 Polymerasekettenreaktion.....	81
4.16 Megaprimer PCR.....	82
4.17 Hefetransformation.....	82
4.18 Isolierung von Hefe-DNA	83
4.19 Messung der sauren Phosphataseaktivität	83
4.20 Isolierung von Hefezellkernen	84
4.21 <i>Cla</i> I-Spaltung von Chromatin.....	84
4.22 <i>DNase</i> I-Spaltung von Chromatin	85

4.23 Auftrennung von DNA in Agarosegelen; Southern Transfer auf geladene Nylonmembranen und Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA.....	85
4.24 Random primed labelling	86
5. Zusammenfassung.....	87
6. Literaturverzeichnis	89
7. Abkürzungsverzeichnis.....	96
Danksagung	
Lebenslauf	

1. Einleitung

Für eine wachsende Zahl von Arten ist die komplette Nukleotidsequenz des Genoms ermittelt. Dieses Wissen stellt eine wichtige Grundlage für die Weiterentwicklung der Molekularbiologie dar. Vergleichsweise begrenzt ist jedoch der Kenntnisstand in Bezug darauf, wie die im Genom gespeicherte Information umgesetzt wird und wie dieser Vorgang reguliert wird.

Für Prokaryoten wurden schon vor längerer Zeit, wie 1961 durch Jacob und Monod, wesentliche Mechanismen der Genregulation aufgedeckt (hier und nachfolgend zusammengefasst aus: Lewin, 1998). Bei den um ganze Größenordnungen komplexeren Eukaryoten ist aber nur wenig über diesen wichtigen Bereich bekannt. Um hier Ansätze zu finden, ist die Auswahl von geeigneten Modellorganismen und exemplarischen Regulationssystemen unerlässlich. Dort gewonnene Erkenntnisse sollten sich zumindest teilweise auf andere Arten und Systeme übertragen lassen und schließlich die Formulierung allgemeingültiger Mechanismen ermöglichen.

Wesentliche Erkenntnisse über die basalen Regulationsmechanismen der Genexpression wurden durch Untersuchungen an der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen. Dieser Organismus ist in vielerlei Hinsicht besonders gut als Modellobjekt geeignet. Kurze Generationszeiten und einfache Kulturbedingungen sind für die meisten experimentellen Fragestellungen von wesentlichem Vorteil. Als Einzeller bietet *S. cerevisiae* zudem grundsätzlich homogene Zellpopulationen, welche bei Vielzellern entweder nicht oder nur artifiziell, über die Isolierung von Zelllinien, zu erhalten sind. Auch das Genom der Hefe ist durch seine geringe Größe, $2 \cdot 10^7$ Basenpaare im Vergleich zu $3,3 \cdot 10^9$ Basenpaaren beim Menschen, relativ überschaubar.

Trotz dieses einfachen Aufbaus besitzt *S. cerevisiae* jene entscheidenden Merkmale, welche diesen Organismus als Modell für eukaryotische Genregulation qualifizieren. Insbesondere die Abgrenzung des genetischen Materials in einem eigenen Kompartiment, dem Zellkern, und die Organisation der DNA des Genoms in einer Chromatinstruktur sind hier hervorzuheben.

Eines der am besten untersuchten Stoffwechselsysteme in *S. cerevisiae* ist der Phosphathaushalt. Phosphatasen und die Regulation ihrer Expression spielen in diesem System eine zentrale Rolle. (Hier und nachfolgend zusammengefasst aus: Ogawa & Oshima, 1990, Lenburg & O'Shea, 1996 und Svaren & Hörz, 1997.)

Unter dem PHO-System in Hefe werden die Gene der Phosphatasen und ihrer Regulatoren zusammengefasst. *PHO5*, *PHO8*, *PHO10* und *PHO11* sind Strukturgene der Phosphatasen. Die Genprodukte von *PHO4* und *PHO2* sind Transaktivatoren. Die Genprodukte von *PHO80* und *PHO85* sind negative Regulatoren der Phosphataseexpression. Das Genprodukt von *PHO81* ist ein indirekter Aktivator der Transkription in diesem System. Diese Regulatoren wirken in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen. Steht den Hefen ausreichend anorganisches Phosphat zur Verfügung, ist die Expression der Phosphatasegene sehr niedrig. Geraten die Zellen jedoch in einen Phosphatmangel wird die Expression dieser Enzyme stark erhöht. Die Phosphatasen, Pho5, Pho10 und Pho11 sind saure Phosphatasen und werden in den periplasmatischen Raum sezerniert. Sie setzen in der Umgebung anorganisches Phosphat für die Zellen frei. Pho8 ist eine alkalische Phosphatase, lokalisiert in der Vakuole der Zellen. Der weit überwiegende Teil der sauren Phosphataseaktivität stammt von *PHO5*. *PHO5* ist zudem das am stärksten regulierte Gen aus der Gruppe der Strukturgene der Phosphatasen. Deshalb steht die Regulation dieses Gens im Zentrum des Interesses.

Auch in dieser Arbeit wurden Aspekte der Regulationsmechanismen von *PHO5* untersucht. Aus einer Vielzahl von Experimenten ist der Aufbau des *PHO5*-Promotors, an dem die entscheidenden Transkriptionsaktivatoren angreifen, bereits im Detail bekannt (siehe Abbildung 1.1; nach Svaren & Hörz, 1997).

Der *PHO5*-Promotor erstreckt sich etwa über einen Bereich von 600 Basenpaaren, unmittelbar stromaufwärts vom Translationsstartpunkt von *PHO5* gelegen. (Unter stromauf- beziehungsweise stromabwärts versteht man konventionsgemäß relative Ortsangaben innerhalb einer DNA-Sequenz, welche sich auf die Transkriptionsrichtung des entsprechenden Gens beziehen.) Solange es der Hefezelle nicht an anorganischem Phosphat mangelt, und damit die *PHO5*-Expression reprimiert ist, können in diesem Bereich vier exakt positionierte Nukleosomen nachgewiesen werden (Almer & Hörz, 1986). Diese Nukleosomen wurden mit den Ziffern –1 bis –4 bezeichnet, geordnet nach zunehmender Entfernung vom Translationsstartpunkt. Bei einer Untersuchung der nativen Chromatinstruktur können die Nukleosomen an diesem Promotor nachgewiesen werden. Dieser Nachweis erfolgt durch die relative Resistenz der mit den Nukleosomen assoziierten DNA gegen die Aktivität von Endonukleasen.

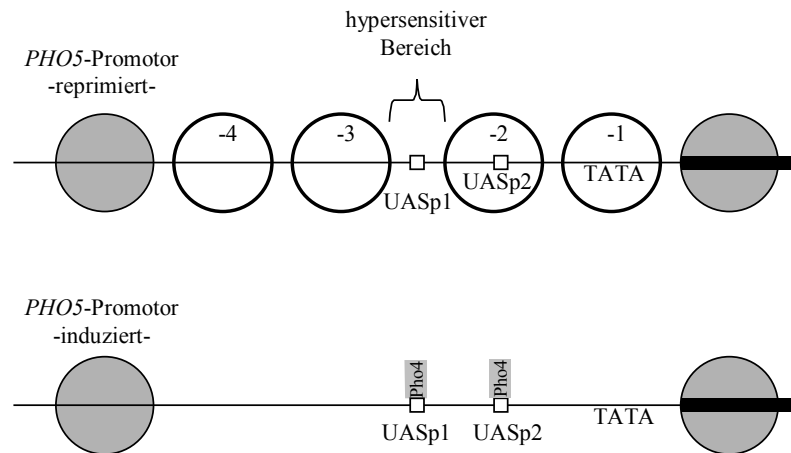


Abbildung 1.1:

Das Bild zeigt die Strukturverhältnisse am reprimierten sowie am induzierten *PHO5*-Promotor. Als weiße Kreise sind die vier positionierten Nukleosomen des *PHO5*-Promotors dargestellt. Nach Induktion des Promotors sind diese Nukleosomen nicht mehr nachweisbar. Stattdessen findet sich Pho4 an den entsprechenden Bindungsstellen (weiße Quadrate). Die Positionen von UASp1, UASp2 und der TATA-Box sind gekennzeichnet. Ein schwarzer Balken zeigt den Beginn der kodierenden Sequenz von *PHO5*.

Zwischen den Nukleosomen -2 und -3 findet sich ein etwa 80 Basenpaare langer DNA-Abschnitt mit besonderen Eigenschaften. Im Chromatin zeigt dieser Bereich im Vergleich zu den benachbarten DNA-Abschnitten eine erhöhte Empfindlichkeit für den Angriff von Nukleasen. Dieser DNA-Abschnitt wird daher als hypersensitiv (für Nukleasen) bezeichnet.

Bei Phosphatmangel kommt es zur Aktivierung von *PHO5*. Der *PHO5*-Promotor weist unter diesen Bedingungen eine deutliche Veränderung auf (Almer *et al.*, 1986). Die Nukleosomen -1 bis -4 sind nicht mehr nachweisbar.

Der gesamte mit diesen Nukleosomen assoziierte DNA-Bereich, er hat eine Länge von etwa 600 Basenpaaren, wird zugänglich für Nukleasen. Die eigentliche Natur dieser Strukturveränderung des Promotors ist aber nicht bekannt. Ob die Histone vollständig oder nur partiell von der DNA dissoziieren, oder ob nur eine Konformationsänderung der Nukleosomen bei erhaltener Bindung der Histonproteine an die DNA zur verstärkten Zugänglichkeit der DNA führt, konnte noch nicht geklärt

werden. Ähnliche Strukturveränderungen des Chromatins wurden auch an anderen Promotoren, wie dem *GALI*- und *GALI0*-Promotor, im Rahmen der Transkriptionsaktivierung beobachtet (Übersicht in: Lohr, 1997).

Der *PHO5*-Promotor weist mehrere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren auf (siehe Abbildung 1.1). Pho4 besitzt zwei Bindungsstellen. Diese werden als UASp1 und UASp2 bezeichnet (Vogel *et al.*, 1989). UASp1 liegt an der Position –360 (auch dies versteht sich als relative Positionsangabe im Sinne der Zahl von Nukleotiden stromaufwärts vom Startpunkt der Translation von *PHO5*) und damit im konstitutiv hypersensitiven DNA-Abschnitt zwischen den Nukleosomen –2 und –3. UASp2 liegt an Position –250, innerhalb des Nukleosoms –2. Bei ausreichender Phosphatversorgung ist keine Bindung von Pho4 an UASp1 oder UASp2 nachweisbar. Unter Phosphatmangel kann eine Bindung sowohl an UASp1 als auch an UASp2 nachgewiesen werden (Venter *et al.*, 1994). Pho2 kann an mehreren Stellen im *PHO5*-Promotor binden (Barbaric *et al.*, 1996). Eine Bindungsstelle überlappt zum Teil mit der Pho4-Bindungsstelle UASp1. Zwei weitere Bindungsstellen flankieren UASp2. Für die Bindung von Pho2 an die genannten Bindungsstellen im *PHO5*-Promotor konnte ein kooperatives Bindungsverhalten mit Pho4 gezeigt werden (Barbaric *et al.*, 1996).

Die Strukturveränderung der vier Nukleosomen des *PHO5*-Promotors im Rahmen der Aktivierung von *PHO5*, sowie ihre Wechselbeziehung mit den Transkriptionsfaktoren wurde in vielen Experimenten untersucht.

Der im Folgenden beschriebene Versuch konnte die Bedeutung der Nukleosomen am Promotor für die Expression von *PHO5* aufzeigen (Straka & Hörz, 1991). Der zum Nukleosom –2 gehörende DNA-Abschnitt wurde durch zwei verschiedene DNA-Fragmente gleicher Länge ersetzt. Eines stammte aus der α -Satelliten-DNA der Afrikanischen Grünen Meerkatze und bildet im nativen Chromatin ein besonders stabiles, positioniertes Nukleosom. Das andere Fragment stammte aus einem bakteriellen Plasmid und hat deshalb keine besondere Tendenz, ein Nukleosom zu bilden. Während das Nukleosom der α -Satelliten-DNA auch bei Phosphatmangel nachweisbar blieb und die *PHO5*-Expression massiv reduzierte, führte die bakterielle Sequenz zu einem konstitutiv aktiven *PHO5*-Promotor. Die Expression von *PHO5* ließ sich durch Phosphatmangel steigern, obwohl die Aktivität des induzierten Wildtyppromotors nicht erreicht wurde. Ein weiteres Experiment, in welchem durch Depletion von Histonen die Bildung der Nukleosomen am Promotor unterdrückt

wurde, konnte eine Aktivierung der *PHO5*-Expression durch das Fehlen der Nukleosomen demonstrieren (Han *et al.*, 1988). Allerdings erreichte die Expression nicht das Ausmaß, welches durch die Aktivierung mittels Pho4/Pho2 erzielt wird.

Diese Versuche zeigen die Bedeutung der Chromatinstruktur am *PHO5*-Promotor für dessen Regulation.

Neben den Nukleosomen haben naturgemäß die Transkriptionsfaktoren einen entscheidenden Einfluss auf das Expressionsniveau von *PHO5*. Bei der Transkriptionsregulation spielt Pho4 die Hauptrolle. Pho2 hat dagegen eine eher akzessorische Funktion. Experimentell konnte dies nachgewiesen werden, indem die Wirkung dieser Faktoren jeweils getrennt voneinander bestimmt wurde. Während Pho4 für sich alleine in der Lage ist, wenn auch nur bei künstlich verstärkter Expression, die Chromatinstruktur am Promotor zu verändern und die Transkription von *PHO5* zu aktivieren, ist Pho2 für sich alleine dazu nicht fähig (Fascher *et al.*, 1990). Wegen der zentralen Bedeutung von Pho4 für die Veränderung der Chromatinstruktur am Promotor und die Aktivierung der Transkription von *PHO5*, ist der Aufbau dieses Proteins und seine Wechselwirkung mit den Elementen des *PHO5*-Promotors von besonderem Interesse. Bei Pho4 konnte eine DNA-Bindungsdomäne abgegrenzt werden (Ogawa & Oshima, 1990). Diese Domäne umfasst 62 Aminosäuren am C-Terminus des Proteins. Die Struktur dieses Bereichs weist ein sogenanntes basic-helix-loop-helix-Motiv auf. Dieses ist typisch für eine Klasse eukaryotischer, DNA-bindender Proteine. Es besteht aus zwei amphipathischen α -Helices, die durch eine Schleife (loop) von ca. 20 Aminosäuren Länge verbunden sind. Im vorderen Abschnitt der ersten Helix liegt eine Gruppierung basischer Aminosäurereste, welche wesentlich an der DNA-Bindung von Pho4 beteiligt sind. Eine weitere Domäne besteht aus den Aminosäuren 190 bis 240 des insgesamt 312 Aminosäuren langen Proteins. Diese Domäne wurde ursprünglich als Oligomerisierungsdomäne bezeichnet und ist für die Interaktion von Pho4 mit Pho2 verantwortlich (Hirst *et al.*, 1994; Komeili & O'Shea, 1999). Sie ermöglicht die kooperative Bindung von Pho4 und Pho2 an den *PHO5*-Promotor (Barbaric *et al.*, 1996). Diese Region ist damit von wesentlicher Bedeutung für die Transkriptionsaktivierung von *PHO5*. Am N-Terminus von Pho4 befindet sich schließlich eine saure Domäne, welche für die transkriptionsaktivierende Funktion von Pho4 verantwortlich ist (Ogawa & Oshima, 1990; Svaren *et al.*, 1994). Da die strukturelle Charakterisierung der transaktivierenden Domäne auch eine Aufgabenstellung dieser Arbeit ist, soll eine Publikation von

McAndrew et al. (1998), welche dieses Thema behandelt, erst im Rahmen der Diskussion vorgestellt werden.

Pho2 ist ein sogenanntes Homöobox-Protein (Berben *et al.*, 1988). Darunter versteht man eine Klasse von eukaryotischen, DNA-bindenden Proteinen, welche als gemeinsames Merkmal eine als Homöobox bezeichnete Domäne enthalten. Diese weist im Vergleich zwischen den Arten ein großes Maß an Homologie auf. Homöobox-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die bei Vielzellern oft eine entscheidende Rolle in der Steuerung der Ontogenese spielen.

Die kooperative Bindung von Pho4 und Pho2 am *PHO5*-Promotor ist essentiell für die Bindung von Pho4 an UASp1 (Barbaric *et al.*, 1998). Ein weiterer Beitrag der Interaktion von Pho2 mit Pho4 zur Aktivierung des *PHO5*-Promotors liegt möglicherweise in der Aufhebung einer intramolekularen Blockade der Aktivierungsdomäne von Pho4 (Shao *et al.*, 1996).

Gegenspieler von Pho4 und Pho2 sind die Proteine Pho80 und Pho85 (Übersicht in: Lenburg & O'Shea, 1996). Pho80 und Pho85 bilden einen Komplex, der durch Phosphorylierung Pho4 inaktiviert. Ein wesentlicher Anteil an diesem Effekt wird der intrazellulären Lokalisation von Pho4 zugeschrieben. Während das phosphorylierte Pho4 vorwiegend im Cytoplasma zu finden ist, liegt nicht-phosphoryliertes und damit aktives Pho4 vorwiegend im Zellkern vor. Zudem blockiert die Phosphorylierung von Pho4 auch die Interaktion mit Pho2 (Komeili & O'Shea, 1999). Der Komplex aus Pho80-Pho85 wird als Cyclin-cyclinabhängige-Kinase-Komplex bezeichnet. Pho80 weist Homologie zu den Hefecyclinen auf. Dies deutet darauf hin, dass hier eine Verbindung zwischen dem Phosphatmetabolismus und der Steuerung des Zellzyklus besteht. Der Pho80-Pho85-Komplex wird durch Pho81, einen Inhibitor cyclinabhängiger Kinasen, gehemmt. Dadurch gehört Pho81 zu den Aktivatoren der Transkription von *PHO5*.

Sowohl die Nukleosomen als auch die Transkriptionsaktivatoren Pho4 und Pho2 stellen also wichtige Elemente in der Regulation der *PHO5*-Expression dar. Es ist daher naheliegend, die Wechselbeziehung zwischen den Nukleosomen und den Transkriptionsfaktoren zu untersuchen.

Mehrere Experimente befassten sich mit dem Einfluss der Nukleosomen auf die Bindung der Transkriptionsfaktoren am Promotor. Da sich UASp1 in einem hypersensitiven DNA-Abschnitt befindet, liegt der Schluss nahe, dass Pho4 hier leichter als an UASp2 binden könnte. Daraus folgt die Hypothese, dass während der Akti-

vierung der Expression von *PHO5*, durch die Bindung von Pho4 an UASp1 die Chromatinstruktur verändert wird und erst so die Bindung von Pho4 an UASp2 ermöglicht wird. Da jedoch Pho4 unter nicht-induzierenden Bedingungen gar nicht, und bei Phosphatmangel, unter Alteration der Nukleosomen am Promotor, immer an beide Bindungsstellen bindet (Venter *et al.*, 1994), musste ein neuer Ansatz diese Annahme belegen. Dazu wurde ein auf seine DNA-Bindungsdomäne reduziertes Pho4 in Hefezellen zur Expression gebracht (Svaren *et al.*, 1994). Das so verkürzte Pho4 ist nicht mehr in der Lage, die Chromatinstruktur des Promotors zu verändern oder die Transkription von *PHO5* zu aktivieren. Es zeigte sich, dass dieses Molekül an UASp1, aber nicht an UASp2 binden kann. Dass dieses Ergebnis nicht durch unterschiedliche Affinität von Pho4 für UASp1 und UASp2 begründet ist, konnte mit dem Austausch der Position von UASp1 und UASp2 gezeigt werden. Das trunkierte Pho4 konnte dann an UASp2, welches nun im hypersensitiven Bereich lag, aber nicht an UASp1, jetzt in Nukleosom -2, binden (Svaren *et al.*, 1994).

Ein weiterer Beleg für die Inhibition der Bindung von Pho4 an UASp2 durch das Nukleosom -2 ergibt sich durch den folgenden Versuch. Hier wurde die Bindungsstelle UASp1 deletiert. Auch unter Phosphatmangel konnte nun an UASp2 keine Bindung von Pho4 nachgewiesen werden. Die Chromatinstruktur am Promotor und das Expressionsniveau entsprach reprimierenden Bedingungen. Durch übermäßige Expression von Pho4 konnte jedoch eine Bindung an UASp2 erreicht werden. Die Nukleosomen -1 bis -4 waren dann nicht mehr nachweisbar (Venter *et al.*, 1994).

Zweifel an der mehr oder weniger direkten Verantwortlichkeit von Pho4 für die Veränderung der Chromatinstruktur am *PHO5*-Promotor im Rahmen der Expressionsaktivierung konnten durch zwei Experimente ausgeräumt werden. Sowohl für die Transkription als auch für die DNA-Replikation erschien es denkbar, treibende Kraft bei der Remodellierung der Chromatinstruktur zu sein. Am *PHO5*-Promotor konnte jedoch, trotz unterbundener Transkription (Fascher *et al.*, 1993), sowie auch bei unterbundener Replikation (Schmid *et al.*, 1992), die bekannte Veränderung der Chromatinstruktur im Rahmen der Genaktivierung nachgewiesen werden.

Für die aktivierende Domäne von Pho4 konnte *in vitro* keine chromatinverändernde Aktivität nachgewiesen werden (Haswell & O'Shea, 1999; Terrell *et al.*, 2002). Es ist also davon auszugehen, dass dieser Effekt durch die Rekrutierung weiterer Faktoren erzielt wird.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Bindung von Pho4 an den *PHO5*-Promotor in funktionell bedeutsamer Interaktion mit den dort befindlichen Nukleosomen erfolgt. Die aktivierende Domäne von Pho4 ist dabei mittelbar für die Remodellierung des Chromatins am Promotor verantwortlich.

Der aktivierenden Domäne von Pho4 kommt also entscheidende Bedeutung zu. Von besonderem Interesse ist daher auch die Beziehung zwischen Struktur und Funktion dieser Domäne. Es sollte darum ermittelt werden, welche strukturellen Motive in der aktivierenden Domäne von Pho4 direkt oder durch Interaktion mit anderen Faktoren für die transkriptionsaktivierende und die chromatinverändernde Funktion von Pho4 verantwortlich sind. Im ersten Teil dieser Arbeit soll durch Herstellung und funktionelle Charakterisierung von zwei Deletionsmutanten von Pho4 ein Beitrag zu dieser Aufgabe geleistet werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll das Verhalten eines heterologen Transkriptionsfaktors am *PHO5*-Promotor untersucht werden. Bei diesem heterologen Transkriptionsfaktor handelt es sich um den GAGA-Faktor (nachfolgend als GAF bezeichnet) aus *Drosophila melanogaster*. GAF wird vom *Trithorax-like* Gen kodiert (Farkas *et al.*, 1994). Es kommen mehrere Isoformen des GAF vor. Hier wird im Weiteren auf eine Hauptform Bezug genommen, die durch ihre Größe von 519 Aminosäuren charakterisiert ist (Soeller *et al.*, 1993). Im GAF lassen sich drei Domänen abgrenzen (Wilkins & Lis, 1997): Die POZ-Domäne liegt im Bereich der Aminosäuren 1-124 am N-Terminus des Proteins. Eine Zinkfinger-Domäne erstreckt sich von der Aminosäure 310 bis zur Aminosäure 372. Die dritte Domäne ist eine glutaminreiche Domäne im Bereich der Aminosäuren 325 bis 519. Der Abschnitt zwischen den Aminosäuren 125 bis 310 wurde bisher nicht charakterisiert und wird von einigen Autoren als X-Domäne bezeichnet (Kosoy *et al.*, 2002; Diese Bezeichnung soll auch hier verwendet werden.). GAF greift in die Regulation einer Vielzahl von Genen bei *D. melanogaster* ein. Er bindet an Wiederholungen der Nukleotidsequenz GAGAG, beziehungsweise GAGTG, im Promotor der betroffenen Gene. Die DNA-Bindung wird von der Zinkfinger-Domäne vermittelt (Pedone *et al.*, 1996). Am N-Terminus des Proteins findet sich die POZ-Domäne. Diese Bezeichnung kürzt den Ausdruck Poxvirus- und Zinkfinger-Domäne ab. Sie beruht auf der Homologie dieser Domäne mit einer größeren Gruppe von ansonsten nicht verwandten Proteinen mit Zinkfinger-Domänen. Die Funktion der POZ-Domäne besteht in der Vermittlung von Interaktion mit anderen Proteinen. Für den GAF

konnte diese Funktion für die Interaktion mit dem Pipsqueak-Protein (Schwendemann & Lehmann, 2002) und mit dem tramtrack-Protein (Pagans *et al.*, 2002) belegt werden. Außerdem hemmt die POZ-Domäne die DNA-Bindung des Proteins, was zu einer erhöhten Spezifität der DNA-Bindung führt (Katsani *et al.*, 1999). Die POZ-Domäne ist möglicherweise auch für die Multimerisierung des GAF verantwortlich. Dies wurde *in vitro* nachgewiesen (Espinás *et al.*, 1999). Die dritte Domäne des GAF ist die glutaminreiche Domäne. Die glutaminreiche Domäne bewirkt eine Multimerisierung des GAF *in vitro* (Wilkins & Lis, 1999). *In vitro* und *in vivo* konnte nachgewiesen werden, dass die glutaminreiche Domäne transkriptionsaktivierend wirkt (Vaquero *et al.*, 2000)

Gene mit GAF-Bindungsstellen lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Zum einen sind dies homöotische Gene wie *Krüppel*, *eve*, *ftz*, *Ubx* und *engrailed*, welche die Differenzierung einzelner Segmente in der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* steuern und nur während der Embryonalentwicklung aktiv sind. Zum anderen sind Gene wie *hsp26*, *hsp70*, *actin 5C*, laminin B2, Adh, Histon H3, Histon H4 und *E74*, die ubiquitär exprimiert werden, zu nennen (Soeller *et al.*, 1993). Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass GAF in der Lage ist, die präformierte Nukleosomenstruktur an seinen Zielpromotoren zu verändern und dabei DNaseI hypersensitive Bereiche zu erzeugen (Tsukiyama *et al.*, 1994; Wall *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1993; Sandaltzopoulos *et al.*, 1995; Okada & Hirose, 1998). Es wurde postuliert, dass GAF seine transaktivierende Funktion durch eine Remodellierung des Chromatins im Sinne einer Derepression der Transkription bewirkt (Croston *et al.*, 1991). Die ungewöhnliche Funktionsweise dieses Proteins begründet ein besonderes Interesse, seine Eigenschaften in einem etablierten Modell wie dem PHO-System zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurde ein chimäres Protein aus GAF und der DNA-bindenden Domäne von Pho4 erzeugt. Um etwaige funktionelle Aktivität näher eingrenzen zu können, wurden außerdem Fusionen aus der N-terminalen und C-terminalen Hälfte des GAF mit der DNA-bindenden Domäne von Pho4 hergestellt.

In beiden Abschnitten der hier vorgelegten Arbeit konnten jeweils neue Erkenntnisse über die untersuchten Faktoren gewonnen werden.

Die Ergebnisse der Experimente zu den *PHO4*-Deletionsmutanten leisten einen wesentlichen Beitrag zur strukturellen Definition der transaktivierenden Domäne von Pho4.

Die in neueren Publikationen aufgezeigten Eigenschaften des GAF, welche im Widerspruch zu vielen älteren Arbeiten stehen, konnten durch die Resultate dieser Arbeit bestätigt werden. Als überraschendes Ergebnis gelang der Nachweis, dass der GAF neben der bereits beschriebenen transaktivierenden Domäne eine zweite Domäne mit dieser Funktion besitzen muss.

2. Ergebnisse

2.1 Deletionsmutanten von Pho4 und ihre Aktivität am *PHO5*-Promotor

2.1.1 Experimentelle Strategie und Zielsetzung

Der erste Teil dieser Arbeit besteht in der Erzeugung von zwei Deletionsmutanten von Pho4, ihrer Expression in *S. cerevisiae* sowie der funktionellen Charakterisierung dieser Moleküle.

Um die zwei gewünschten Derivate von Pho4 zu erhalten, mußte die für das Wildtypprotein kodierende DNA-Sequenz in diesem Sinne modifiziert werden. Mit Hilfe einer auf der Polymerasekettenreaktion basierenden Methode konnten zwei entsprechende DNA-Sequenzen hergestellt werden. Die erste Sequenz kodiert ein Pho4-Derivat mit einer Deletion der Aminosäuren 97 bis 106 (siehe Abbildung 2.1; *PHO4*-Sequenz aus: Legrain *et al.*, 1986). Die zweite kodiert ein Derivat mit einer Deletion der Aminosäuren 101 bis 110. Die modifizierten Sequenzen wurden anschließend durch Sequenzierung der veränderten Abschnitte auf die korrekte Einführung der Deletionen überprüft. Die Pho4-Derivate wurden daraufhin in entsprechenden Expressionsvektoren in *S. cerevisiae* transformiert. Die funktionelle Aktivität der Pho4-Mutanten konnte schließlich bestimmt werden. Dazu wurde die transkriptionsaktivierende Aktivität durch Messung der Phosphataseaktivität bestimmt.

2.1.2 Gezielte Mutagenese des *PHO4*-Gens mittels der Megaprimer Methode

Die Polymerasekettenreaktion (nachfolgend wird hierfür die allgemein übliche, auf den englischen Ausdruck *polymerase chain reaction* zurückgehende Abkürzung PCR verwendet) ermöglicht nicht nur die einfache Vervielfältigung beliebiger DNA-Sequenzen, sondern auch die einfache Herstellung von modifizierten Kopien der Originalsequenz. Diese Abwandlungen werden durch Starteroligonukleotide (nachfolgend wird hierfür der allgemein übliche englische Ausdruck Primer verwendet), welche von der Originalsequenz abweichen, erzeugt. Da die Länge eines Primers technisch limitiert ist, können durch eine PCR primär nur Modifikationen an den Enden der Originalsequenz erzeugt werden. Um diese Einschränkung zu umgehen, wurden viele auf der PCR basierende Protokolle entwickelt, welche die Einführung von Mutationen an beliebiger Position innerhalb der Originalsequenz ermöglichen.

Abbildung 2.1:
Sequenz des *PHO4*-Gens mit Translation in das Pho4-Protein:

1	AAG	CTT	TCT	TGA	AAC	ACT	TTC	TCG	AAC	CTC	AAA	TCA	GGT	ATG	TTC
46	AAA	TGT	TTG	TTG	GGA	GTT	GGC	GCC	GTA	GGT	ACG	TTC	ATT	TCT	ACG
91	TTC	CCA	CAG	TTT	TTT	TTC	TTG	CTG	CCT	TGC	CTT	CTT	TGC	GTA	CGG
136	TGT	GTA	TGT	GTA	TGT	CTG	TGT	GCA	AGT	ACT	TCC	TAC	GCT	GCA	ACT
181	GCG	ATT	TTC	TCG	TTT	TCT	ATT	TTT	TTT	TTT	TGC	CTC	GCC	TAA	TAT
Primer P-for GAA AGG CTG ACC CGG->															
226	GTG	GTA	GGC	GAA	AGG	CTG	ACC	CGG	CCG	CTC	GCA	CGG	AAA	TAT	TTG
271	GCA	AAT	GAG	TCT	TGA	CCA	TAG	AAA	AAT	GTA	TAT	AAC	GAG	GGA	AGA
316	AGT	CAT	GCT	TCG	GAA	GGA	CCA	GAA	GAG	AAG	AGA	TGA	GCA	AAG	GAG
361	ACA	GAA	CAA	GAG	TAG	CAG	AAA	GTC	Met	Gly	Arg	Thr	Thr	Ser	Glu-
									ATG	GGC	CGT	ACA	ACT	TCT	GAG
406	Gly	Ile	His	Gly	Phe	Val	Asp	Asp	Leu	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Ile-
	GGA	ATA	CAC	GGT	TTT	GTG	GAC	GAT	CTA	GAG	CCC	AAG	AGC	AGC	ATT
--XbaI--															
451	Leu	Asp	Lys	Val	Gly	Asp	Phe	Ile	Thr	Val	Asn	Thr	Lys	Arg	His-
	CTT	GAT	AAA	GTC	GGA	GAC	TTT	ATC	ACC	GTA	AAC	ACG	AAA	CGG	CAT
496	Asp	Gly	Arg	Glu	Asp	Phe	Asn	Glu	Gln	Asn	Asp	Glu	Leu	Asn	Ser-
	GAT	GGG	CGC	GAG	GAC	TTC	AAC	GAG	CAA	AAC	GAC	GAG	CTG	AAC	AGT
541	Gln	Glu	Asn	His	Asn	Ser	Ser	Glu	Asn	Gly	Asn	Glu	Asn	Glu	Asn-
	CAA	GAG	AAC	CAC	AAC	AGC	AGT	GAG	AAT	GGG	AAC	GAG	AAT	GAA	AAT
586	Glu	Gln	Asp	Ser	Leu	Ala	Leu	Asp	Asp	Leu	Asp	Arg	Ala	Phe	Glu-
	GAA	CAA	GAC	AGT	CTC	GCG	TTG	GAC	GAC	CTA	GAC	CGC	GCC	TTT	GAG
631	Leu	Val	Glu	Gly	Met	Asp	Met	Asp	Trp	Met	Met	Pro	Ser	His	Ala-
	CTG	GTG	GAA	GGT	ATG	GAT	ATG	GAC	TGG	ATG	ATG	CCC	TCG	CAT	GCG
Deletion 97-106 Deletion 101-110															
676	His	His	Ser	Pro	Ala	Thr	Thr	Ala	Thr	Ile	Lys	Pro	Arg	Leu	Leu-
	CAC	CAC	TCC	CCA	GCT	ACA	ACT	GCT	ACA	ATC	AAG	CCG	CGG	CTA	TTA
721	Tyr	Ser	Pro	Leu	Ile	His	Thr	Gln	Ser	Ala	Val	Pro	Val	Thr	Ile-
	TAT	TCG	CCG	CTA	ATA	CAC	ACG	CAA	AGT	GCG	GTT	CCC	GTA	ACC	ATT
766	Ser	Pro	Asn	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Ser	Ala	Thr	Ser	Ala	Asn-
	TCG	CCG	AAC	TTG	GTC	GCT	ACT	GCT	ACT	TCC	GCC	ACA	TCC	GCT	AAC
811	Lys	Val	Thr	Lys	Asn	Lys	Ser	Asn	Ser	Ser	Pro	Tyr	Leu	Asn	Lys-
	AAA	GTC	ACT	AAA	AAC	AAG	AGT	AAT	AGT	AGT	CCG	TAT	TTG	AAC	AAG
856	Arg	Lys	Gly	Lys	Pro	Gly	Pro	Asp	Ser	Ala	Thr	Ser	Leu	Phe	Glu-
	CGC	AAA	GGT	AAA	CCC	GGG	CCG	GAT	TCG	GCC	ACT	TCG	CTG	TTC	GAA
--SmaI-															
901	Leu	Pro	Asp	Ser	Val	Ile	Pro	Thr	Pro	Lys	Pro	Lys	Pro	Lys	Pro-
	TTG	CCC	GAC	AGC	GTT	ATC	CCA	ACT	CCG	AAA	CCG	AAA	CCG	AAA	CCA
946	Lys	Gln	Tyr	Pro	Lys	Val	Ile	Leu	Pro	Ser	Asn	Ser	Thr	Arg	Arg-
	AAG	CAA	TAT	CCG	AAA	GTT	ATT	CTG	CCG	TCG	AAC	AGC	ACA	AGA	CGC

991	Val	Ser	Pro	Val	Thr	Ala	Lys	Thr	Ser	Ser	Ser	Ala	Glu	Gly	Val-
	GTA	TCA	CCG	GTC	ACG	GCC	AAG	ACC	AGC	AGC	AGC	GCA	GAA	GGC	GTG
1036	Val	Val	Ala	Ser	Glu	Ser	Pro	Val	Ile	Ala	Pro	His	Gly	Ser	Thr-
	GTC	GTA	GCA	AGT	GAG	TCT	CCT	GTA	ATC	GCG	CCG	CAC	GGA	TCG	ACC
1081	His	Ala	Arg	Ser	Leu	Ser	Lys	Arg	Arg	Ser	Ser	Gly	Ala	Leu	Val-
	CAT	GCG	CGG	TCG	CTG	AGT	AAG	CGA	CGG	TCA	TCG	GGC	GCG	CTC	GTG
1126	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg	Glu	Ser	His	Lys	His	Ala	Glu	Gln	Ala	Arg-
	GAC	GAT	GAC	AAG	CGC	GAA	TCA	CAC	AAG	CAT	GCA	GAG	CAA	GCA	CGG
1171	Arg	Asn	Arg	Leu	Ala	Val	Pro	Leu	His	Glu	Leu	Ala	Ser	Leu	Ile-
	CGT	AAT	CGA	TTA	GCG	GTC	CCG	CTG	CAC	GAA	CTG	GCG	TCT	TTA	ATC
1216	Pro	Ala	Glu	Trp	Lys	Gln	Gln	Asn	Val	Ser	Ala	Ala	Pro	Ser	Lys-
	CCC	GCG	GAG	TGG	AAA	CAG	CAA	AAT	GTG	TCG	GCC	GCG	CCG	TCC	AAA
1261	Ala	Thr	Thr	Val	Glu	Ala	Ala	Cys	Arg	Tyr	Ile	Arg	His	Leu	Gln-
	GCG	ACC	ACC	GTG	GAG	GCG	GCC	TGC	CGG	TAC	ATC	CGT	CAC	CTA	CAG
1306	Gln	Asn	Gly	Ser	Thr	***									
	CAG	AAC	GGG	AGC	ACG	TGA	CCG	TGC	ACC	AAT	GGG	AAG	CAC	GTT	CCG
	<-C	TTG	CCC	TCG	TGC	AC	Primer P-rev								
1351	GGC	ATA	TCG	GAC	TGG	GGC	GCG	CCT	CCC	TGC	GCG	GTG	CTT	GTT	ATA
1396	AGA	GGC	GTT	TGC	TGG	AAA	GTG	GCC	CAC	ACC	GGG	TTT	TCG	AGA	TTA
1441	GGA	CCT	ACT	CAG	TCT	TAA	GGG	CAG	TAT	TGG	TTG	GCG	CTT	ATT	TGC
1486	ACA	TAT	TGT	ATA	CAC	GCA	CTC	ACA	TTA	ACA	GAA	GCA	CAC	TTA	TAC
1531	ACT	TAC	ACC	TAC	ACA	CAC	GGA	TAA	AGA	AAA	AGA	AA			

Die Abbildung zeigt neben der Nukleotidsequenz von *PHO4* auch die Aminosäuresequenz des Pho4-Proteins. Das Startkodon sowie das Stopkodon sind hervorgehoben. Zudem sind die Erkennungssequenzen für XbaI und SmaI, welche für das experimentelle Vorgehen bedeutsam waren, gekennzeichnet. Schließlich sind die nicht-mutagenen Primer, die in der Megaprimer-PCR verwendet wurden, dargestellt. Die beiden eingeführten Deletionen sind durch schwarze Balken markiert.

Da die hier geplanten Deletionen von Pho4 vergleichsweise zentral in der kodierenden Sequenz liegen, war in diesem Fall die Anwendung eines solchen Protokolls erforderlich. Die hier verwendete Megaprimermethode besitzt wesentliche Vorteile gegenüber anderen Verfahren (Sarkar & Sommer, 1990).

Da die bei der PCR verwendeten DNA-Polymerasen mit einer Rate von einem Fehler auf Tausend addierten Nukleotiden vergleichsweise häufig unbeabsichtigte Mutationen erzeugen, ist eine möglichst geringe Zahl von PCR-Zyklen anzustreben. Die Megaprimermethode benötigt mit zwei Polymerasekettenreaktionen, im Vergleich zu drei Reaktionen bei anderen Verfahren, eine geringere Zahl von Zyklen. Des weiteren ist hier die vorangehende Synthese von nur drei Primern erforderlich. Das Prinzip der Megaprimermethode ermöglicht es, die Beschränkung der klassischen PCR zu umgehen.

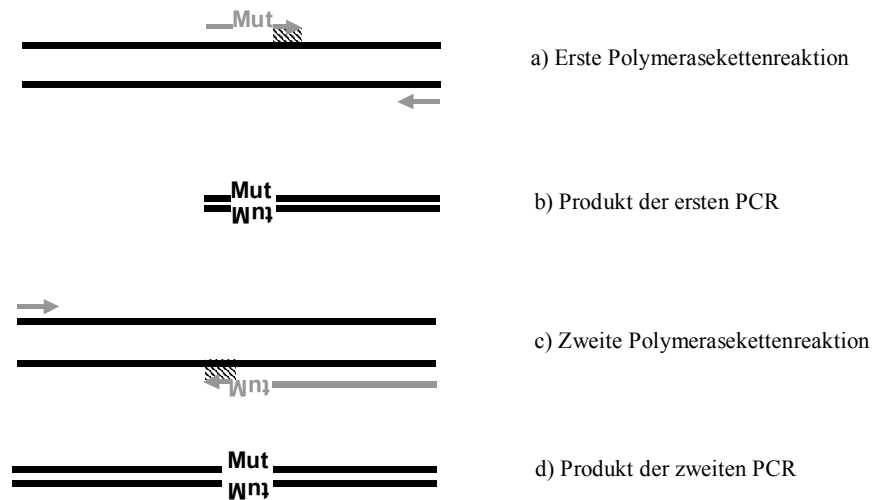


Abbildung 2.2:

Diese Abbildung demonstriert das Prinzip der Megaprimer-PCR.

Im Teilbild a) sind die Bedingungen der ersten Polymerasekettenreaktion dargestellt. Die Matrize ist als dissoziierter Doppelstrang in schwarzer Farbe abgebildet. Die Primer werden durch graue Pfeile symbolisiert. In dieser Reaktion wird die Mutation mit Hilfe eines entsprechenden Primers in die Reaktionsprodukte eingefügt. Mit dem mutagenen Primer wird ein nicht-mutagener Primer kombiniert.

Das Bild b) zeigt das Produkt der ersten Reaktion. Es ist zu erkennen, daß ein großer Teil der Matrize in diesem Produkt nicht enthalten ist. Dieser Teil der Matrize wird mit Hilfe der zweiten Polymerasekettenreaktion angefügt.

Wie in c) dargestellt, muß dazu das Produkt der ersten Reaktion als Primer eingesetzt werden. Dieser Megaprimer wird mit einem zweiten, nicht-mutagenen Primer kombiniert.

Das in d) gezeigte Produkt der zweiten Reaktion umfaßt die gesamte Länge der Matrize und enthält die beabsichtigte Mutation.

Eine bestimmte Eigenschaft des mutagenen Primers ist für die Methode von wesentlicher Bedeutung. Der Primer muss sowohl am 5' Ende, als auch am 3' Ende der Mutation einen mit der Matrize vollständig komplementären Bereich von 10 - 15 Basenpaaren Länge besitzen. Diese Abschnitte ermöglichen jeweils in einer der beiden Polymerasekettenreaktionen die Bindung des Primers (Bild a) oder des Megaprimers (Bild c) an die Matrize und somit die Verlängerung durch die Polymerase (Die jeweils bindenden Abschnitte des Primers sind in der Abbildung durch die schwarze Schraffur gekennzeichnet).

Dabei wird in einer ersten PCR nur ein Teilabschnitt der Originalsequenz vervielfältigt (siehe Abbildung 2.2). Dieser Abschnitt erstreckt sich von einem Ende der Sequenz bis zum Ort der gewünschten Mutation. In dieser ersten Reaktion kann also die Mutation einfach durch die Veränderung der Nukleotidsequenz des entsprechenden Primers in das Reaktionsprodukt eingebaut werden. Die zweite PCR wird nun benötigt, um mit Hilfe des mutierten Teilabschnitts der Originalsequenz die gesamte Sequenz zu erzeugen. Dazu wird der in der ersten Reaktion erzeugte Abschnitt als

einer von zwei Primern in der zweiten Reaktion eingesetzt. Da es sich hier, im Vergleich zu einem gewöhnlichen Primer, um ein sehr langes Oligonukleotid handelt, wird dieser als Megaprimer bezeichnet. Da der Megaprimer als doppelsträngiges DNA-Molekül vorliegt, sind die Reaktionsbedingungen in der Polymerasekettenreaktion deutlich erschwert. Um die Assoziation des Megaprimers mit der Matrize gegenüber der Reassoziaton mit seinem Gegenstrang zu begünstigen, muß die Matrizen-DNA in deutlich erhöhter Konzentration eingesetzt werden. Das in dieser Reaktion entstandene Produkt ist die gewünschte, mutierte DNA-Sequenz. Die hier beabsichtigte Einführung je einer Deletion in die kodierende Sequenz für das Wildtyp-Pho4 wurde dementsprechend bewerkstelligt. Der mutierte Primer hat für die Deletion $\Delta 97-106$ die Bezeichnung P $\Delta 97-106$ und für die Deletion $\Delta 101-110$ die Bezeichnung P $\Delta 101-110$ (siehe Abbildung 2.3a und 2.3b; die Sequenzen dieser und aller folgenden Primer sind im Abschnitt Material und Methoden aufgeführt). Diese Primer wurden jeweils zusammen mit einem sogenannten reversen Primer, welcher etwa 630 Basenpaare stromabwärts von den Mutationen bindet und als P-rev bezeichnet wird, in eine erste Reaktion eingesetzt. (Unter einem reversen Primer versteht man das Starternukleotid in einer Polymerasekettenreaktion, von dem die Synthese des Gegenstranges des kodierenden Stranges ausgeht.) Als Matrize wurde ein mit dem Restriktionsenzym HindIII einfach gespaltenes Plasmid mit der Bezeichnung pP4-70 (beschrieben als YepP4 in: Svaren *et al.*, 1994), welches die kodierende Sequenz für das Wildtyp-Pho4 enthält, verwendet. Das entstandene Produkt war jeweils ein etwa 650 Basenpaare langes DNA-Molekül. Dieses entsprach dem DNA Abschnitt von etwa 20 Basenpaare stromaufwärts der Mutationen bis etwa 630 Basenpaare stromabwärts der Mutationen. Die gewünschten Deletionen waren in diesen Molekülen durch die Verwendung der mutierten Primer bereits enthalten. Um diese mutierten DNA-Sequenzen zur Gesamtsequenz vervollständigen zu können, mußte noch ein längerer DNA-Abschnitt stromaufwärts der Mutationen angefügt werden. Dazu wurden die Reaktionsprodukte nach einem Reinigungsschritt als Megaprimer in eine zweite PCR eingesetzt. Zudem wurde hier ein entsprechender Primer, welcher etwa 460 Basenpaare stromaufwärts von den Deletionen in der *PHO4*-Sequenz bindet, verwendet. Dieser hat die Bezeichnung P-for. Als Matrize wurde hier nochmals das gespaltene Plasmid pP4-70, wie in der ersten Reaktion, verwendet.

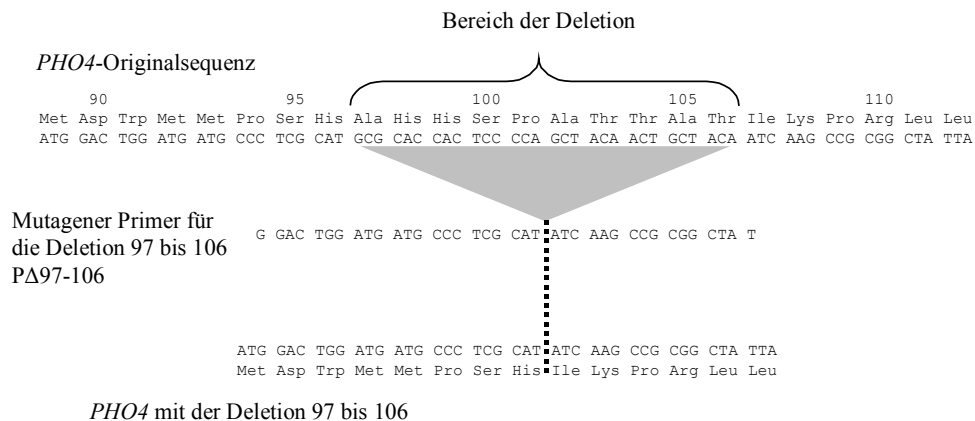


Abbildung 2.3a:

Diese Abbildung zeigt einen Ausschnitt der Nukleotidsequenz von *PHO4* und der zugehörigen Aminosäuresequenz im Vergleich mit der Sequenz von *PHO4* mit der Deletion 97 bis 106. Außerdem wird der Aufbau des mutagenen Primers demonstriert, welcher zur Herstellung der Deletion 97 bis 106 in *PHO4* durch die Megaprimer-PCR verwendet wurde.

Endprodukt dieser Reaktion war nun eine DNA-Sequenz, die jeweils die gewünschte Deletion in einem etwa 1060 Basenpaare langen Abschnitt der *PHO4*-Sequenz enthielt.

2.1.3 Amplifikation und Verifikation der *PHO4*-Derivate

In den gewonnenen DNA-Sequenzen findet sich je ein Erkennungsmotiv für die Restriktionsenzyme XbaI und SmaI. Die Erkennungssequenzen liegen jeweils stromaufwärts (XbaI) und stromabwärts (SmaI) in Bezug auf die eingeführten Mutationen. Darum konnten beide Enzyme verwendet werden um ein entsprechendes Fragment aus dem Reaktionsprodukt auszuschneiden. Um dieses Fragment in das Plasmid pP4-70 einfügen zu können, mußte auch dieses mit XbaI und SmaI behandelt werden. Voraussetzung für die Verwendung von XbaI und SmaI war, dass die Erkennungssequenzen beider Enzyme in pP4-70 nur einmal vorkamen (siehe Abbildung 2.1 und 2.4). Die benötigten DNA-Fragmente wurden anschließend durch eine elektrophoretische Auftrennung der Reaktionsansätze in einem Agarosegel isoliert. Die Restriktionsenzyme wurden so gewählt, dass ein möglichst kleines Fragment aus den Reaktionsprodukten ausgeschnitten wurde.

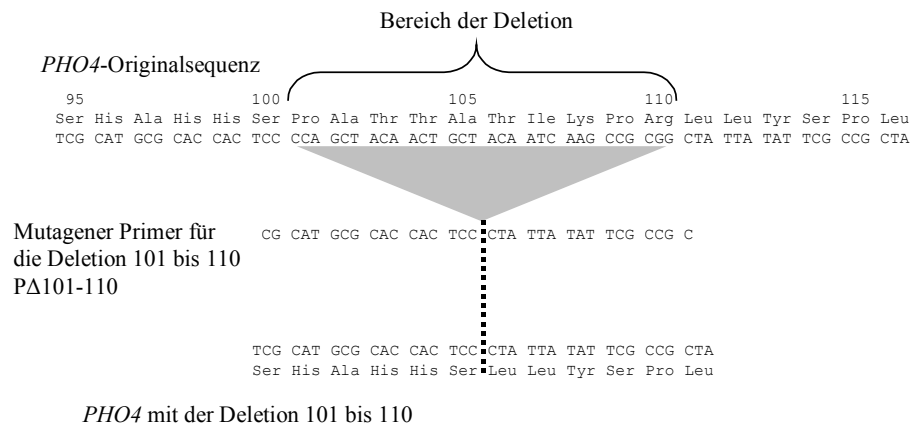


Abbildung 2.3b:

Diese Abbildung zeigt einen Ausschnitt der Nukleotidsequenz von *PHO4* und der zugehörigen Aminosäuresequenz im Vergleich mit der Sequenz von *PHO4* mit der Deletion 101 bis 110. Außerdem wird der Aufbau des mutagenen Primers demonstriert, welcher zur Herstellung der Deletion 101 bis 110 in *PHO4* durch die Megaprimer-PCR verwendet wurde.

Dies geschah mit der Absicht, den DNA-Abschnitt, der möglicherweise unerwünschte Mutationen durch die PCR enthielt, so kurz wie möglich zu halten. Die aufgereinigten Fragmente wurden in einer Ligierung zu einem intakten Plasmid verbunden. Als Derivate des Plasmids pP4-70 erhielten die Konstrukte die Bezeichnung pP4-70-Δ97-106 und pP4-70-Δ101-110. Die ligierten Plasmide wurden anschließend in *E. coli* transformiert. Der Transformationsansatz wurde auf ampicillinhaltigen Nährmediumplatten aufgebracht. Das Antibiotikum erlaubt dabei eine Selektion transformierter Zellen, da das verwendete Plasmid eine Ampicillin-Resistenz vermittelt. Jeweils 15 der daraus resultierenden Bakterienkolonien wurden in kleinem Maßstab kultiviert. Aus diesen Kulturen gewonnene Präparationen der Plasmid-DNA wurden zuerst durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen HindIII und BanII daraufhin überprüft, ob das korrekte Plasmid mit dem eingefügten PCR-Produkt enthalten war. In einer Agarose-Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Anhand der erwarteten Fragmentgrößen (4231, 1108, 682, 435 und 93 Basenpaare; siehe Abbildung 2.5) konnten die untersuchten Klone grob daraufhin überprüft werden, ob sie das erwartete Plasmid enthielten. Anschließend wurde jeweils ein Klon ausgewählt und mit Hilfe weiterer Restriktionsenzyme näher untersucht.

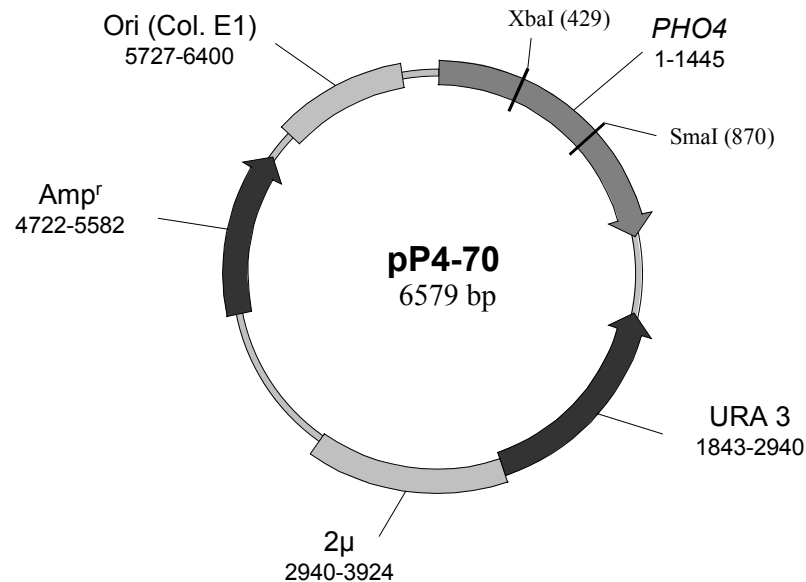


Abbildung 2.4:

Karte des Plasmids pP4-70. Es finden sich jeweils die wesentlichen funktionellen Elemente mit Angabe ihrer genauen Lokalisation im Plasmid. Das Plasmid enthält eine Ampicillinresistenz (*Amp^r*) zur Selektion in *E. coli*, sowie das *URA3*-Gen zur Selektion in *S. cerevisiae*. Der Abschnitt 2μ steuert die Replikation in *S. cerevisiae* während *Ori (Col. E1)* die Replikation in *E. coli* steuert. pP4-70 enthält schließlich das *PHO4*-Gen. Die für das experimentelle Vorgehen wesentlichen Restriktionschnittstellen von *XbaI* und *SmaI* sind gekennzeichnet.

Dazu wurden die Enzyme *PvuII* zusammen mit *DraI* und *ClaI* mit *HindIII* verwendet. Die Fragmentgrößen (für *PvuII* mit *DraI*: 3251, 2587, 692 und 19 Basenpaare; für *ClaI* mit *HindIII*: 5405 und 1144 Basenpaare) bestätigten das Vorliegen der erwarteten Plasmide (siehe Abbildung 2.6). Es wurden weitere Testspaltungen mit den Restriktionsenzymen *KspI* und *SphI* durchgeführt. Die Verwendung dieser Enzyme ermöglichte den direkten Nachweis der eingeführten Deletionen. Durch die Deletionen wurde die Erkennungssequenz für *KspI* in pP4-70-Δ101-110 und für *SphI* in pP4-70-Δ97-106 zerstört (siehe Abbildung 2.6). Im jeweils anderen Konstrukt blieben die Erkennungssequenzen erhalten. Daher konnten die Deletionen jeweils durch das Fehlen eines Fragmentes nachgewiesen werden.

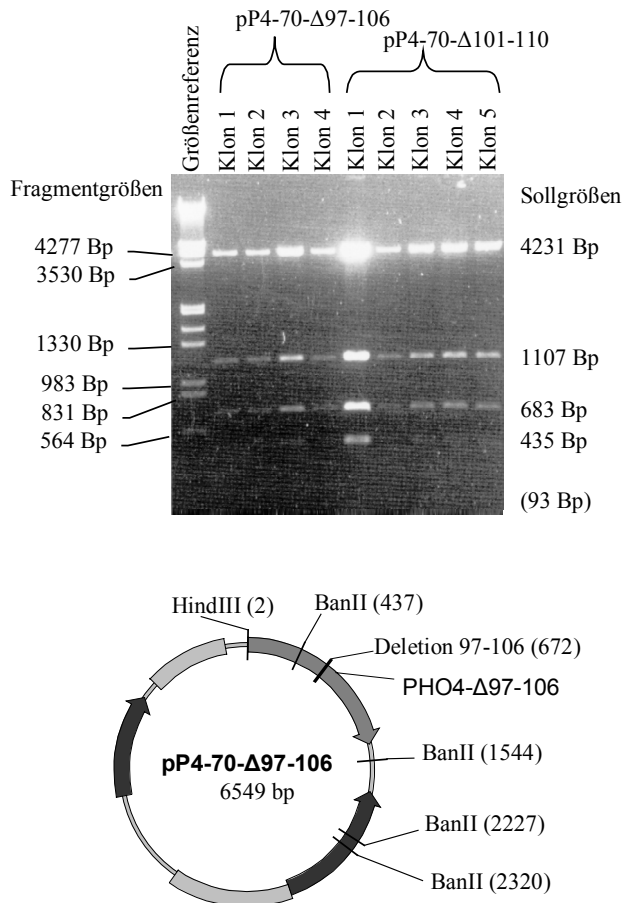


Abbildung 2.5:

Agarosegelelektrophorese von Restriktionsspaltungsansätzen mit vier Klonen für das Plasmid pP4-70-Δ97-106 und mit fünf Klonen für das Plasmid pP4-70-Δ101-110. Es wurden jeweils die Restriktionsenzyme HindIII mit BanII verwendet. Die bei korrekten Klonen erwarteten Fragmentgrößen sind angegeben. Der Vergleich mit den Banden der Größenreferenz zeigt für jeden Klon eine Übereinstimmung der erwarteten mit den gefundenen Größen. Die Schemazeichnung des Plasmids (pP4-70-Δ101-110 besitzt hier die gleichen Eigenschaften) zeigt, dass die ausgewählten Restriktionsenzyme sowohl im Plasmid, als auch im eingefügten Fragment spalten. Das korrekte Bandenmuster belegt dadurch die Identität des Plasmids und des Fragments.

Da beide Testspaltungen parallel mit beiden Konstrukten durchgeführt wurden, stellte das jeweils andere Konstrukt, mit der erhaltenen Erkennungssequenz, eine Positivkontrolle dar. (Die erwarteten Fragmentgrößen waren für KspI: 6549 Basenpaare bei pP4-70-Δ101-110, sowie 6041 und 508 Basenpaare bei pP4-70-Δ97-106; für SphI: 6096 und 453 Basenpaare bei pP4-70-Δ101-110, sowie 6549 Basenpaare bei pP4-70-Δ97-106). Auch hier stimmten die erwarteten Fragmentgrößen mit den erhaltenen Fragmentgrößen überein.

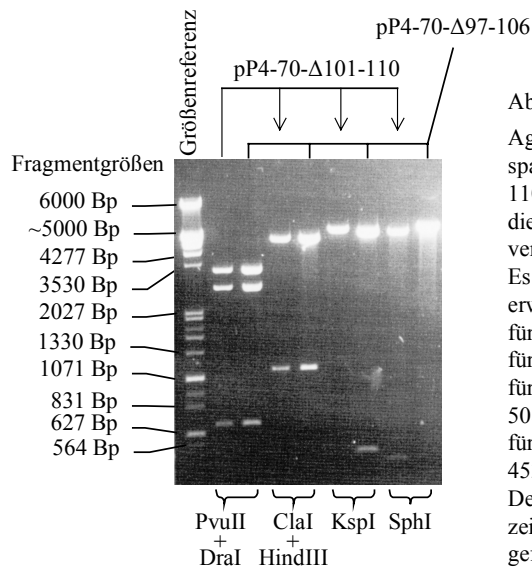


Abbildung 2.6:

Agarosegelelektrophorese von je vier Restriktions-spaltungsansätzen mit den Plasmiden pP4-70-Δ101-110 und pP4-70-Δ97-106, die den korrekten Aufbau dieser Plasmide belegen. Es sind jeweils die verwendeten Restriktionsenzyme angegeben.

Es war der Nachweis folgender Fragmentgrößen zu erwarten:

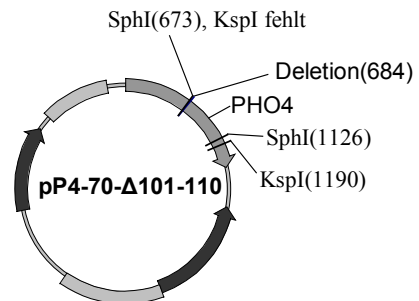
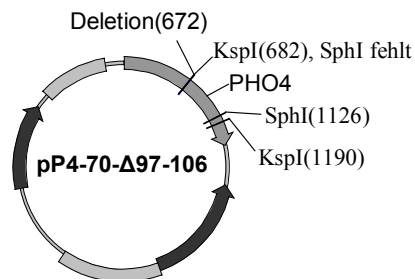
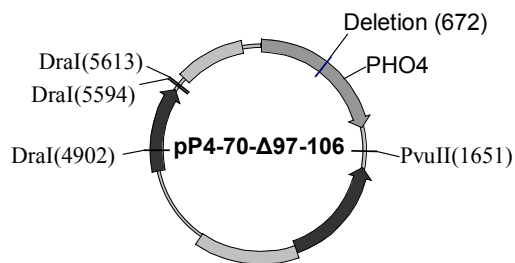
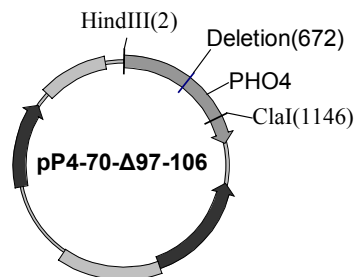
für PvuII und DraI: 3251, 2587, 692 und (19) Bp;

für ClaI und HindIII: 5405 und 1144 Bp;

für KspI nur bei pP4-70-Δ97-106 ein Fragment mit 508 Bp;

für SphI nur bei pP4-70-Δ101-110 ein Fragment mit 453 Basenpaaren;

Der Vergleich mit den Banden der Größenreferenz zeigt die Übereinstimmung der erwarteten mit den gefundenen Größen. Schemazeichnungen der Plasmide mit den entsprechenden Schnittstellen verdeutlichen das Prinzip dieser Restriktionsspaltungen. Wo die Positionen der Schnittstellen identisch sind, ist jeweils nur pP4-70-Δ97-106 dargestellt. Die Ansätze mit KspI und SphI sind für jedes Plasmid in einem Schema zusammengefasst.



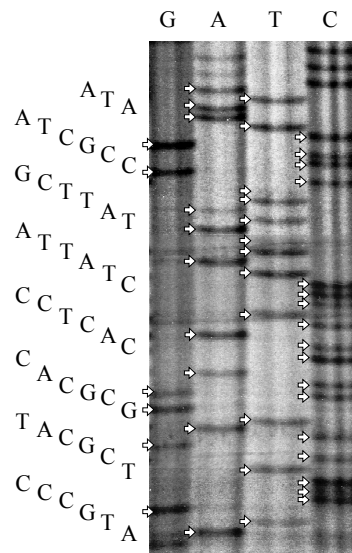


Abbildung 2.7:

Exemplarisch wird hier die Sequenzreaktion für die *PHO4*-Sequenz mit der Deletion der Basen für die Aminosäuren 101 bis 110 dargestellt. Auf der Abbildung der Gelelektrophorese sind die gewerteten Banden mit einem Pfeil markiert. Die daraus resultierende Basensequenz ist in der Orientierung vom Unter- zum Oberrand des Gels angegeben. Der Bereich enthält, abgesehen von der korrekt eingefügten Deletion, keine Abweichungen von der Originalsequenz.

Deletion
↓

```

ATG CCC TCG CAT GCG CAC CAC TCC CTA TTA TAT TCG CCG
CTA ATA
  
```

Für beide Deletionsmutanten konnte auf diese Weise ein korrekter Klon nachgewiesen werden. Mit diesen Klonen wurde eine Plasmidpräparation in größerem Maßstab durchgeführt. Die gewonnene DNA wurde dazu verwendet, mittels einer Sequenzreaktion zu überprüfen, ob die jeweilige Deletion in der gewünschten Form enthalten war. Dazu wurde ein Primer mit der Bezeichnung P-seq verwendet. Für beide Konstrukte konnte so der korrekte Aufbau belegt werden (siehe Abbildung 2.7).

2.1.4 Transformation der *PHO4*-Deletionskonstrukte in *Saccharomyces cerevisiae*

In pP4-70-Δ97-106 und pP4-70-Δ101-110 waren nun die Deletionsvarianten von *PHO4* an Stelle der Originalsequenz enthalten. Das Plasmid pP4-70, als Grundlage beider Konstrukte, ermöglicht neben der Propagation in *E. coli* auch die stabile Transformation von Hefezellen als episomales Plasmid (siehe Abbildung 2.4). Die sogenannte 2μ-Sequenz bedingt dabei die Replikation und den Erhalt des Plasmids

in hoher Kopienzahl (zwanzig bis fünfzig Kopien in einer Zelle) in *S. cerevisiae*. pP4-70 besitzt außerdem die *URA3*-Sequenz. Diese kodiert für ein Enzym im Syntheseweg von Uracil. Die zur Transformation verwendeten Hefestämme besitzen kein funktionstüchtiges *URA3*-Gen und sind somit auxotroph für Uracil. Durch die *URA3*-Sequenz des Plasmids wird diese Auxotrophie komplementiert. Mit Uracil-freien Nährmedien kann somit eine Selektion von Transformanten nach der Transformation des Plasmids in *S. cerevisiae* erfolgen. In dieser Weise wird auch bei der weiteren Kultivierung der Transformanten ein Verlust des Plasmids verhindert. Schließlich verfügt pP4-70 über die *PHO4*-Sequenz unter der Kontrolle des natürlichen *PHO4*-Promotors.

Der für die Transformation verwendete Hefestamm YS33 (Svaren *et al.*, 1994) besitzt folgenden Genotyp: MAT α , *his3-11*, *his3-15*, *leu2-3*, *leu2-112*, *can^R*, *ura3 Δ 5*, *Δ pho4::ura3 Δ 5*, *Δ pho80::HIS3*. Dieser Hefestamm hat damit für das experimentelle Vorgehen wichtige Eigenschaften. YS33 ist unter anderem auxotroph für Uracil. Die Auxotrophie wurde durch partielle Deletion des *URA3*-Gens erzeugt. Wie bereits erläutert, ermöglicht diese Auxotrophie die Selektion von Transformanten. Außerdem besitzt YS33 kein funktionelles *PHO4*-Gen. Das Fehlen dieses Gens ermöglicht es, die Eigenschaften der Pho4-Derivate ohne Störung durch das Wildtyp-Pho4 zu untersuchen. YS33 ist schließlich auch defizient für Pho80. Wie bereits beschrieben, hemmt Pho80 die Aktivität von Pho4 bei ausreichender Phosphatversorgung.

Diese Interaktion könnte durch die erzeugten Deletionen in unvorhersehbarer Weise beeinflusst werden. Die Auswirkung der Deletionen in Pho4 auf die Aktivität des Proteins wäre so von Effekten durch die eventuell veränderte Wechselwirkung mit Pho80 nicht zu unterscheiden. Damit stellt das Fehlen von Pho80 in YS33 ebenfalls einen Vorteil für die beabsichtigten Experimente dar.

Zellen von YS33 wurden mit den Plasmiden pP4-70- Δ 97-106 und pP4-70- Δ 101-110 transformiert. Mittels Kultivierung auf Uracil-Mangelmedien konnten erfolgreich transformierte Zellen kloniert werden. Es wurden jeweils drei beliebige Klone für die nachfolgenden Experimente ausgewählt.

2.1.5 Untersuchung der Aktivität der Pho4-Derivate durch Messung der Phosphataseaktivität

In pP4-70-Δ97-106 und pP4-70-Δ101-110 stehen die Pho4-Derivate unter der Kontrolle des natürlichen *PHO4*-Promotors. Dieser ist konstitutiv auf niedrigem Niveau aktiv. Da die Plasmide in hoher Kopienzahl in den Hefezellen vorliegen, resultiert aufgrund des Gen-Dosis Effektes auch eine relativ starke Expression der Pho4-Derivate. Da in YS33 Pho4 nicht durch Pho80 reprimiert wird, ist bereits unter normalen Phosphatkonzentrationen ein deutlicher Effekt zu erwarten, wenn die Pho4-Derivate funktionell aktiv sind.

Durch Messung der Phosphataseaktivität sollte untersucht werden, inwieweit die Pho4-Derivate trotz der eingeführten Deletionen in der Lage sein würden, die Transkription am *PHO5*-Promotor zu aktivieren.

Die Bestimmung der Phosphataseaktivität ermöglicht keine Unterscheidung zwischen den einzelnen Phosphatasen. Pho5 stellt aber den weit überwiegenden Anteil der sezernierten Phosphataseaktivität in *S. cerevisiae*. Darum kann durch Messung der Phosphataseaktivität der Hefezellen auf die Menge an in das Periplasma sezerniertem Pho5 geschlossen werden.

Um die Bestimmung durchzuführen, wurden je drei Klone für beide Konstrukte in Kulturmedium mit normaler Phosphatkonzentration angezogen. Bei Erreichen einer logarithmischen Wachstumsphase wurde zum einen ein Teil der Zellen geerntet, zum anderen wurden Zellen in phosphatfreies Medium überführt. Auch die Zellen im phosphatfreien Medium wurden nach einer entsprechenden Zeitspanne geerntet. Die Aktivitätsbestimmung mit den in einem Reaktionspuffer aufgenommenen Zellen, erfolgte durch die Umsetzung eines chromogenen Substrates (Haguenauer-Tsapis & Hinnen, 1984). Die photometrische Messung der Farbintensität nach Ablauf einer definierten Reaktionszeit erlaubt die Berechnung der Phosphataseaktivität. Um einen Vergleich der Aktivitäten zu ermöglichen, wird diese Aktivität zu der eingesetzten Zellmenge in Bezug gesetzt.

Zum Vergleich wurde auch die Phosphataseaktivität von untransformierten Zellen der Stämme YS31 (Svaren *et al.*, 1994) und YS33 unter beiden Kulturbedingungen gemessen. YS31 besitzt im Gegensatz zu YS33 noch ein funktionelles *PHO4*-Gen und bildet damit eine Positiv-Kontrolle. Bei YS33 fehlt Pho4. Mit diesem Stamm kann deshalb die Hintergrund-Phosphataseaktivität bestimmt werden.

Klon / Stamm	Phosphataseaktivität bei normaler Phosphatversorgung	Phosphataseaktivität bei Phosphatmangel
YS31	180 / 169	-
YS33	2,04 / 2,78	-
Pho4-Δ97-106 in YS33	45,5 / 48,1	52,1 / 52,2
	193 / -	143 / 150
	182 / -	162 / 157
Pho4-Δ101-110 in YS33	196 / 189	167 / 165
	194 / 200	189 / 187
	220 / 239	216 / 207

Tabelle 2.1:

Die Tabelle zeigt die Meßwerte für die Phosphataseaktivität (in U/OD₆₀₀) der mit den zwei *PHO4*-Deletionskonstrukten transformierten Hefen im Vergleich mit der Phosphataseaktivität der als Kontrollen verwendeten Stämme YS31 und YS33. Bei der Messung wurden größtenteils Doppelbestimmungen durchgeführt. Für die Transformanten wurde nicht nur die Aktivität bei normalen Phosphatkonzentrationen sondern auch nach Induktion durch Phosphatmangel bestimmt. Bei den Transformanten wurden zudem Messungen von jeweils drei verschiedenen Klonen durchgeführt.

Die ermittelten Phosphataseaktivitätswerte lagen für beide Pho4-Derivate unter Kulturbedingungen mit normalen Phosphatkonzentrationen über den für YS31 bestimmten Werten (siehe Tabelle 2.1). Bei einem Klon des pP4-70-Δ97-106 Konstruktes zeigten sich abweichende Phosphataseaktivitätswerte.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist ein negativer Selektionsdruck auf Hefezellen durch ein konstant hohes Expressionsniveau von Pho4-abhängigen Genen. Aufgrund des Selektionsdruckes ist es hier vermutlich zur Etablierung eines Zellklons mit abweichendem Phänotyp gekommen. Grundlage dieser Eigenschaft kann zum Beispiel eine Herabregulierung der Kopienzahl des Expressionsplasmids sein. Ein solches Phänomen tritt häufig bei Expressionsplasmiden mit der 2μ-Sequenz auf, wenn diese die Expression eines für die Zellen ungünstigen Produktes bedingen.

Unter Kulturbedingungen mit niedrigen Phosphatkonzentrationen konnte keine Steigerung der Phosphataseaktivität beobachtet werden. Unter Berücksichtigung der hohen Phosphataseaktivität bei normalen Phosphatkonzentrationen war dieses Er-

gebnis jedoch zu erwarten. Es wurde bereits bei früheren Untersuchungen beobachtet, dass Zellen, die ein funktionell aktives Pho4 besitzen, gleichzeitig für Pho80 defizient sind und zusätzlich einem Phosphatmangel ausgesetzt werden, im Wachstum stark gehemmt sind. Dies ist wahrscheinlich auf die Auswirkungen eines konstant hohen Expressionsniveaus von Pho4-abhängigen Genen zurückzuführen. Hefezellen, die diesen Bedingungen ausgesetzt werden, zeigen regelhaft ein paradoxes Verhalten der Phosphataseaktivität.

Zusammenfassend ergibt sich für beide Pho4-Derivate, dass den jeweils deletierten Bereichen keine wesentliche, funktionelle Bedeutung bei der Transkriptionsaktivierung am *PHO5*-Promotor durch Pho4 zukommt.

2.2 Chimäre GAF-Pho4 Moleküle und ihre Aktivität am *PHO5*-Promotor

2.2.1 Experimentelle Strategie und Zielsetzung

Der zweite Teil dieser Arbeit besteht in der Erzeugung von drei chimären Molekülen. Diese setzen sich zusammen aus GAF und der DNA-bindenden Domäne von Pho4, sowie jeweils der N-terminalen und der C-terminalen Hälfte von GAF und der DNA-bindenden Domäne von Pho4. Diese Moleküle sollten mit Hilfe verschiedener Plasmide in *S. cerevisiae* exprimiert und ihre Aktivität am *PHO5*-Promotor charakterisiert werden.

Um die chimären Proteine erzeugen zu können, mußten zunächst die kodierenden Sequenzen für den GAF und die DNA-bindende Domäne von Pho4 zusammengefügt werden (siehe Abbildung 2.8a, 2.8b und 2.9; Für die Klonierung wurde ein Derivat von *PHO4*, beschrieben als $\Delta 2$ in Svaren *et al.* (1994), verwendet). Dazu wurden mittels einer Polymerasekettenreaktion geeignete Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme in die *GAF*-Sequenz eingefügt. Diese mußten so gewählt werden, dass für die *GAF*-Sequenz und die *PHO4*-Sequenz, nach der Zusammenführung über die Schnittstellen, ein gemeinsames Leseraster für die Translation entstehen konnte.

Durch Sequenzierung der entsprechenden Abschnitte des *GAF* mußten auch hier unbeabsichtigte Mutationen durch die PCR ausgeschlossen werden. Da nur die beiden Enden der *GAF*-Sequenz zur Erzeugung der Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme verändert werden mußten, konnte die Größe der Abschnitte, welche zu überprüfen waren, erheblich reduziert werden. Zu diesem Zweck wurde ein 1420 Basenpaare langes DNA-Fragment in der Mitte der modifizierten *GAF*-Sequenz, unter Nutzung bereits in der ursprünglichen Sequenz vorhandener Restriktionsschnittstellen von *MunI* und *SphI* (siehe Abbildung 2.9), durch den entsprechenden Abschnitt der originären DNA ersetzt.

Nach erfolgreicher Überprüfung konnte die *GAF*-Sequenz mit der kodierenden Sequenz für die DNA-bindende Domäne von Pho4 verbunden werden. Die entstandene Gesamtsequenz kodiert also für ein chimäres Protein, bei dem die transkriptionsaktivierende Domäne von Pho4 durch den GAF ersetzt wurde (siehe Abbildung 2.8a, 2.8b und 2.9).

Um die beiden Konstrukte mit jeweils nur einer Hälfte des GAF zu erzeugen, wurde eine in der Wildtyp-Sequenz des GAF vorkommende Restriktionsschnittstelle benutzt. Die im Codon für die Aminosäure 245 liegt (siehe Abbildung 2.8c und 2.8d).

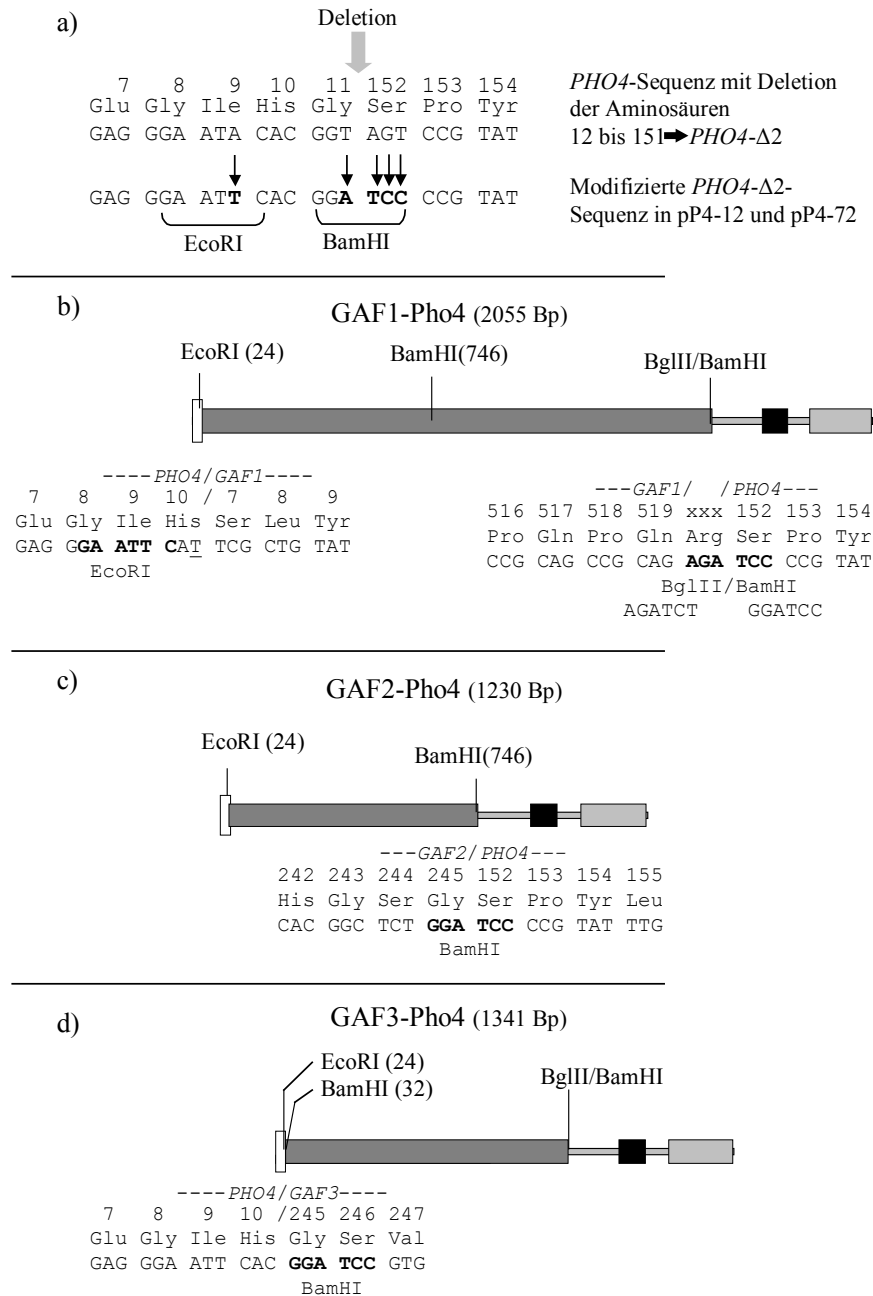


Abbildung 2.8:

Schematischer Aufbau und Klonierstrategie für die GAF-Pho4 Konstrukte.

a) Die Abbildung zeigt die veränderte DNA-Sequenz von *PHO4*-Δ2 sowie das Ausmaß der Deletion in *Pho4*-Δ2. Es werden außerdem die notwendigen Veränderungen der Basen-

sequenz zur Einführung der Erkennungsstellen für EcoRI und BamHI dargestellt. Diese bedingen jedoch keine weitere Änderung in der Aminosäuresequenz von Pho4. (Svaren *et al.*, 1994)

- b) GAF1-Pho4 Konstrukt (Die für die Aminosäuren 7 bis 519 des GAF kodierende Sequenz wird hier als GAF1 bezeichnet). Das Schema zeigt den Aufbau des Konstruktes aus den ersten 10 Aminosäuren von Pho4 (helles Rechteck), dem GAF1 (dunkelgraues Rechteck), der Pho2-Interaktionsdomäne von Pho4 (schwarzes Rechteck) und der DNA-bindenden Domäne von Pho4 (hellgraues Rechteck). An den Übergangsstellen zwischen den *PHO4*-Sequenzabschnitten und der *GAF*-Sequenz (vergleiche Abbildung 2.9) ist jeweils ein Ausschnitt der Nukleotidsequenz mit den verwendeten Restriktionsenzymen gezeigt. Die PCR-gestützte Einführung der Restriktionsschnittstellen von EcoRI und BglII in die *GAF*-Sequenz erfolgte unter der Berücksichtigung des Translationsleserasters (siehe angegebene Aminosäuresequenz). Die Verbindung der BglII-Schnittstelle (*GAF*-Sequenz) mit der BamHI-Schnittstelle (*PHO4*-Sequenz) führt zur Zerstörung beider Erkennungssequenzen (Die Erkennungssequenzen beider Enzyme sind angegeben). Wie aus der Abbildung zu ersehen ist, wurde in der PCR auch ein Teil der *PHO4*-Sequenz (in ihr liegt die EcoRI-Schnittstelle) über den Primer GAF-for in die *GAF*-Sequenz eingebaut (vergleiche Abbildung 2.9). Dabei wurde durch den Primer GAF-for das letzte Nukleotid des Histidincodons der Aminosäure 10 der *PHO4*-Sequenz als stumme Mutation von C nach T verändert (vergleiche a) mit b)) Die Positionsangaben in der Abbildung, sowie die Größenangaben bei den Konstrukten beziehen sich auf die Nukleotide der kodierenden DNA-Sequenz.
- c) GAF2-Pho4 Konstrukt (Die für die Aminosäuren 7 bis 245 des GAF kodierende Sequenz wird hier als GAF2 bezeichnet). Das Schema zeigt den Aufbau des Konstruktes analog zu b). Hier wurde die in der Mitte der *GAF*-Sequenz liegende BamHI-Schnittstelle verwendet. Wie aus der angegebenen Aminosäuresequenz zu ersehen ist, geschah dies unter Wahrung des Translationsleserasters. Die Verwendung der EcoRI-Schnittstelle erfolgte wie unter b) gezeigt.
- d) GAF3-Pho4 Konstrukt (Die für die Aminosäuren 245 bis 519 des GAF kodierende Sequenz wird hier als GAF3 bezeichnet). Für diese Klonierung wurde in der *PHO4*- $\Delta 2$ -Sequenz nur die BamHI-Schnittstelle genutzt (siehe a)). Das Fragment der *GAF*-Sequenz wurde über die interne BamHI-Schnittstelle und die C-terminale BglII-Schnittstelle in die geöffnete BamHI-Schnittstelle der *PHO4*-Sequenz eingesetzt. An beiden Übergangsstellen blieb das Translationsleseraster erhalten (die Verbindung der BglII-Schnittstelle mit der BamHI-Schnittstelle erfolgte wie in b) gezeigt).

Sie ist damit in etwa in der Mitte des GAF gelegen. Bei der Nutzung dieser Schnittstelle blieb das Leseraster der Translation erhalten. So konnten jeweils auch beide Hälften des GAF mit dem *PHO4*-Derivat verknüpft werden.

Da die kodierende Sequenz für die DNA-bindende Domäne von Pho4 bereits in Expressionsplasmiden für *S. cerevisiae* vorlag, konnten die drei Konstrukte sofort in den entsprechenden Plasmiden zusammengesetzt werden.

Die funktionelle Aktivität der chimären Moleküle wurde zuerst durch Messung der Phosphataseexpression bestimmt. Anschließend wurde die Veränderung der Chromatinstruktur am *PHO5*-Promotor durch die Konstrukte untersucht.

2.2.2 Modifikation der *GAF*-Sequenz mittels der Polymerasekettenreaktion

Um die *GAF*-Sequenz in die *PHO4*-Sequenz einfügen zu können, war es notwendig an den Enden der *GAF*-Sequenz Erkennungsstellen für bestimmte Restriktionsenzyme zu erzeugen (siehe Abbildung 2.9; *GAF*-cDNA-Sequenz aus: Soeller *et al.*, 1993). Durch den ersten Primer mit der Bezeichnung *GAF*-for wurde am Anfang der *GAF*-Sequenz die Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *EcoRI* erzeugt. Die *EcoRI* Erkennungssequenz wurde verwendet, um die *GAF*-Sequenz unter Erhalt des Translationsleserasters in die *PHO4*-Sequenz zu integrieren (siehe Abbildung 2.8). Durch den zweiten Primer mit der Bezeichnung *GAF*-rev wurden am Ende der *GAF*-Sequenz Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *BglIII* und *HindIII* erzeugt. Das Enzym *BglIII* wurde benötigt um die *GAF*-Sequenz in die *PHO4*-Sequenz einzufügen (siehe Abbildung 2.8). Das zweite Enzym, *HindIII* ermöglichte den Einbau der *GAF*-Sequenz in das Plasmid Bluescript-SK⁻. Die *GAF*-Sequenz mußte zunächst in dieses Plasmid eingefügt werden, um eine Sequenzierung der durch die PCR modifizierten Abschnitte vorzunehmen.

Bei der Durchführung der erläuterten Polymerasekettenreaktion wurde als Matrize ein Plasmid mit der kodierenden Sequenz für *GAF* eingesetzt. Das Plasmid war vorher mit dem Restriktionsenzym *ClaI* einfach gespalten worden. Das Produkt der Polymerasekettenreaktion war 1563 Basenpaare lang.

2.2.3 Klonierung und Sequenzierung der modifizierten *GAF*-Sequenz

Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt und dann mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* gespalten. Der Reaktionsansatz wurde danach mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Das in dieser Weise isolierte DNA-Fragment wurde nochmals gereinigt. Anschließend wurde es in einer Ligierung in das ebenfalls durch *HindIII* und *EcoRI* gespaltene Plasmid Bluescript-SK⁻ eingefügt. Das Plasmid konnte nun in *E. coli* transformiert werden. Von 26 isolierten Klonen wurden DNA-Präparationen in kleinem Maßstab durchgeführt. Proben dieser Präparationen wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* inkubiert. Eine Agarosegelelektrophorese zeigte für einen Klon ein mit dem erwarteten Muster übereinstimmendes Fragmentmuster (2946 und 1553 Basenpaare; siehe Abbildung 2.10). Die Plasmid-DNA dieses Klons wurde mit weiteren Restriktionsenzymen untersucht.

Abbildung 2.9:
Sequenz der cDNA des GAGA-Faktors mit Translation in das GAGA-Faktor-Protein:

	Met	Ser	Leu	Pro	Met	Asn	Ser	Leu	Tyr	Ser	Leu	Thr	Trp	Gly	Asp-
1	ATG	TCG	CTG	CCA	ATG	AAT	TCG	CTG	TAT	TCG	CTC	ACC	TGG	GGC	GAT
	Primer GAF-for G CGA ATT CAT TCG CTG TAT TCG C->														
	--EcoRI-														
46	Tyr	Gly	Thr	Ser	Leu	Val	Ser	Ala	Ile	Gln	Leu	Leu	Arg	Cys	His-
	TAC	GGC	ACC	AGC	CTC	GTA	TCG	GCA	ATC	CAA	TTG	TTG	CGC	TGC	CAT
	--MunI-														
91	Gly	Asp	Leu	Val	Asp	Cys	Thr	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Arg	Ser	Phe-
	GGC	GAC	CTC	GTC	GAT	TGC	ACG	TTG	GCC	GCC	GGC	GGG	CGG	AGT	TTT
136	Pro	Ala	His	Lys	Ile	Val	Leu	Cys	Ala	Ala	Ser	Pro	Phe	Leu	Leu-
	CCC	GCC	CAC	AAG	ATA	GTC	CTG	TGC	GCC	GCC	TCC	CCC	TTT	CTG	CTG
181	Asp	Leu	Leu	Lys	Asn	Thr	Pro	Cys	Lys	His	Pro	Val	Val	Met	Leu-
	GAC	TTG	CTA	AAG	AAT	ACA	CCA	TGC	AAG	CAT	CCA	GTG	GTT	ATG	TTG
226	Ala	Gly	Val	Asn	Ala	Asn	Asp	Leu	Glu	Ala	Leu	Leu	Glu	Phe	Val-
	GCT	GGC	GTC	AAT	GCG	AAC	GAT	CTG	GAG	GCG	CTG	CTG	GAG	TTT	GTG
271	Tyr	Arg	Gly	Glu	Val	Ser	Val	Asp	His	Ala	Gln	Leu	Pro	Ser	Leu-
	TAC	CGC	GGA	GAG	GTG	AGC	GTG	GAT	CAC	GCC	CAG	CTG	CCG	TCG	CTA
316	Leu	Gln	Ala	Ala	Gln	Cys	Leu	Asn	Ile	Gln	Gly	Leu	Ala	Pro	Gln-
	CTG	CAG	GCT	GCC	CAG	TGC	CTG	AAC	ATC	CAG	GGA	CTG	GCA	CCG	CAG
361	Thr	Val	Thr	Lys	Asp	Asp	Tyr	Thr	Thr	His	Ser	Ile	Gln	Leu	Gln-
	ACG	GTT	ACC	AAG	GAC	GAC	TAC	ACC	ACG	CAC	TCG	ATA	CAA	CTG	CAG
406	His	Met	Ile	Pro	Gln	His	His	Asp	Gln	Asp	Gln	Leu	Ile	Ala	Thr-
	CAC	ATG	ATT	CCA	CAA	CAT	CAC	GAC	CAA	GAC	CAA	CTG	ATT	GCC	ACG
451	Ile	Ala	Thr	Ala	Pro	Gln	Gln	Thr	Val	His	Ala	Gln	Val	Val	Glu-
	ATC	GCC	ACG	GCT	CCA	CAG	CAA	ACG	GTT	CAT	GCC	CAG	GTG	GTG	GAG
496	Asp	Ile	His	His	Gln	Gly	Gln	Ile	Leu	Gln	Ala	Thr	Thr	Gln	Thr-
	GAC	ATC	CAT	CAT	CAG	GGC	CAG	ATT	CTC	CAG	GCA	ACG	ACC	CAG	ACC
541	Asn	Ala	Ala	Gly	Gln	Gln	Gln	Thr	Ile	Val	Thr	Thr	Asp	Ala	Ala-
	AAC	GCA	GCA	GGA	CAA	CAG	CAG	ACC	ATT	GTG	ACA	ACC	GAC	GCG	GCT
586	Lys	His	Asp	Gln	Ala	Val	Ile	Gln	Ala	Phe	Leu	Pro	Ala	Arg	Lys-
	AAA	CAT	GAC	CAG	GCA	GTG	ATT	CAG	GCT	TTT	CTT	CCG	GCA	CGC	AAA
631	Arg	Lys	Pro	Arg	Val	Lys	Lys	Met	Ser	Pro	Thr	Ala	Pro	Lys	Ile-
	CGC	AAA	CCA	CGC	GTA	AAG	AAA	ATG	TCA	CCT	ACG	GCA	CCG	AAA	ATA
676	Ser	Lys	Val	Glu	Gly	Met	Asp	Thr	Ile	Met	Gly	Thr	Pro	Thr	Ser-
	AGC	AAA	GTT	GAA	GGA	ATG	GAT	ACG	ATT	ATG	GGC	ACA	CCG	ACC	TCT
721	Ser	His	Gly	Ser	Gly	Ser	Val	Gln	Gln	Val	Leu	Gly	Glu	Asn	Gly-
	TCA	CAC	GGC	TCT	GGA	TCC	GTG	CAG	CAG	GTG	CTT	GGC	GAA	AAT	GGA
	-BamHI-														
766	Ala	Glu	Gly	Gln	Leu	Leu	Ser	Ser	Thr	Pro	Ile	Ile	Lys	Ser	Glu-
	GCC	GAG	GGC	CAA	CTG	CTA	TCA	TCC	ACA	CCG	ATC	ATC	AAG	AGC	GAA
811	Gly	Gln	Lys	Val	Glu	Thr	Ile	Leu	Thr	Met	Asp	Pro	Asn	Asn	Met-
	GGA	CAA	AAG	GTA	GAG	ACT	ATT	CTC	ACC	ATG	GAC	CCC	AAC	AAC	ATG

856	Ile	Pro	Val	Thr	Ser	Ala	Asn	Ala	Ala	Thr	Gly	Glu	Ile	Thr	Pro-
	ATA	CCG	GTA	ACG	TCG	GCT	AAT	GCG	GCA	ACT	GGC	GAG	ATA	ACA	CCA
901	Ala	Gln	Gly	Ala	Thr	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Ser	Gly	Val-
	GCA	CAA	GGA	GCC	ACT	GGC	TCA	TCT	GGC	GGC	AAT	ACA	AGC	GGC	GTC
946	Leu	Ser	Thr	Pro	Lys	Ala	Lys	Arg	Ala	Lys	His	Pro	Pro	Gly	Thr-
	CTA	TCC	ACG	CCA	AAG	GCA	AAA	CGC	GCT	AAA	CAT	CCG	CCC	GGA	ACA
991	Glu	Lys	Pro	Arg	Ser	Arg	Ser	Gln	Ser	Glu	Gln	Pro	Ala	Thr	Cys-
	GAG	AAA	CCA	CGT	TCA	CGA	TCA	CAA	TCT	GAA	CAA	CCT	GCT	ACT	TGC
1036	Pro	Ile	Cys	Tyr	Ala	Val	Ile	Arg	Gln	Ser	Arg	Asn	Leu	Arg	Arg-
	CCC	ATT	TGC	TAT	GCT	GTC	ATT	CGT	CAA	TCC	CGG	AAC	CTG	CGG	CGC
1081	His	Leu	Glu	Leu	Arg	His	Phe	Ala	Lys	Pro	Gly	Val	Lys	Lys	Glu-
	CAT	CTC	GAG	CTG	CGG	CAT	TTT	GCC	AAA	CCC	GGC	GTG	AAG	AAG	GAG
1126	Lys	Lys	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Asp	Thr	Thr	Leu	Asp	Ser	Ser	Met-
	AAG	AAA	AGT	AAG	TCC	GGT	AAC	GAT	ACA	ACC	CTA	GAC	TCC	AGC	ATG
1171	Glu	Met	Asn	Thr	Thr	Ala	Glu	Gly	Asp	Asn	Thr	Val	Gly	Ser	Asp-
	GAG	ATG	AAC	ACC	ACG	GCA	GAG	GGC	GAC	AAC	ACA	GTG	GGC	AGT	GAT
1216	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ser	Ala	Gly	Gly	Gln	Ser	Ser	Gly	Thr-
	GGA	GCA	GGC	GGA	GCA	GGA	TCA	GCA	GGA	GGA	CAA	TCA	TCT	GGT	ACG
1261	Thr	Pro	Thr	Arg	Val	Ile	Ser	Asn	Ala	Pro	Gln	Ala	Ala	Gly	Ala-
	ACG	CCA	ACG	AGA	GTG	ATA	TCG	AAT	GCA	CCG	CAG	GCC	GCG	GGG	GCG
1306	Pro	Ala	Ile	Leu	Ala	Gln	Gly	Val	Leu	Pro	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln-
	CCG	GCC	ATC	CTG	GCC	CAA	GGT	GTG	CTG	CCC	CAG	CAG	CAG	CAA	CAG
1351	Gln	Gln	Leu	Gln	Gln	Gln	His	Gln	Gln	His	Leu	Thr	Ala	Thr	Leu-
	CAG	CAA	CTG	CAG	CAG	CAA	CAC	CAG	CAG	CAC	TTG	ACA	GCA	ACA	TTA
1396	Ala	Gly	Gly	Gly	Gln	Ala	Tyr	Ile	Lys	His	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly-
	GCG	GGT	GGT	GGA	CAG	GCA	TAC	ATC	AAA	CAT	GAG	GGC	GGC	GGC	GGG
1441	Gly	Gly	Thr	Gly	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Ala	Ala	Gln	Gln	Gln-
	GGC	GGC	ACT	GGG	CAG	CAG	CAG	CAA	CAG	CAA	GCG	GCA	CAA	CAG	CAG
1486	Gly	Met	Gln	Asn	Val	Ile	His	Ile	Val	Gly	Asp	Gln	Val	Phe	Ile-
	GGC	ATG	CAG	AAC	GTC	ATA	CAC	ATT	GTG	GGC	GAT	CAG	GTC	TTC	ATA
	--SphI--														
1531	Pro	Gln	Gln	Gln	Gln	Pro	Gln	Pro	Gln	***					
	CCG	CAG	CAG	CAA	CAG	CCG	CAG	CCG	CAG	TAG					
	<-GTC GGC GTC GGC GTC TCT AGA TTC GAA AG														
	-BqlIII- HindIII														
	Primer														
	GAF-rev														

Die Abbildung zeigt neben der cDNA-Sequenz des GAF auch die zugehörige Aminosäuresequenz. Das Startkodon sowie das Stopkodon sind hervorgehoben. Die bei der Polymerasekettenreaktion verwendeten mutagenen Primer sind angegeben. Durch den ersten Primer wird eine EcoRI-Schnittstelle eingefügt. Die Position der Schnittstelle ermöglicht es, die *GAF*-Sequenz unter Erhalt des Leserasters in die *PHO4*-Sequenz zu integrieren. Durch den zweiten Primer werden die Schnittstellen von BglII und HindIII eingeführt. Durch die Einführung von BglII wird das Stopkodon durch das Triplet für die Aminosäure Arginin ersetzt (durch Umrahmung hervorgehoben). Schließlich sind die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme MunI, BamHI und SphI, welche ebenfalls für das experimentelle Vorgehen bedeutsam waren, angegeben.

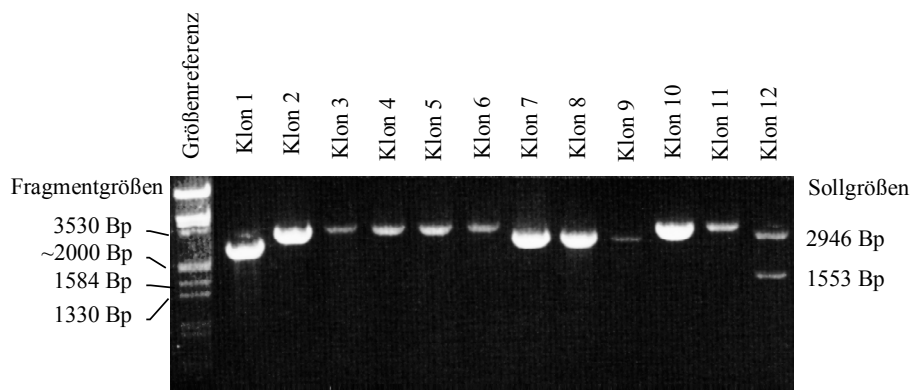
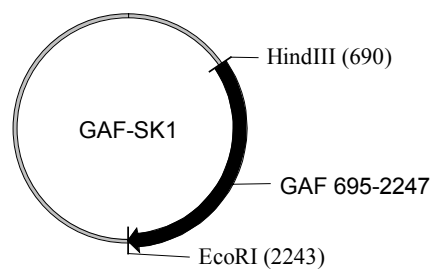


Abbildung 2.10:

Agarosegelelektrophorese von Restriktionsspaltungsansätzen mit zwölf Klonen für das Plasmid GAF-SK 1. Es wurden jeweils die Restriktionsenzyme EcoRI mit HindIII verwendet. Die bei korrekten Klonen erwarteten Fragmentgrößen sind angegeben. Der Vergleich mit den Banden der Größenreferenz zeigt nur für den Klon 12 eine Übereinstimmung der erwarteten mit den gefundenen Größen. Unten ist schematisch das Prinzip der Testspaltung dargestellt. Durch die beiderseits des eingefügten Fragments liegenden Schnittstellen im Vektor wird bei korrekten Plasmiden ein Fragment mit einer dem GAF entsprechenden Größe herausgeschnitten.



Die gefundenen Fragmentgrößen (für BamHI: 3759 und 740 Basenpaare; für MunI mit SphI: 3089 und 1410; für MunI mit ScaI: 2612 und 1887 Basenpaare; schließlich für SphI mit ScaI: 3297 und 1202 Basenpaare) bestätigten das Vorliegen eines korrekten Plasmides, welches die entsprechende *GAF*-Sequenz enthielt (siehe Abbildung 2.11). Der Klon und seine Plasmidpräparation werden als GAF-SK 1 bezeichnet.

Aus einer Kultur des entsprechenden *E. coli*-Klons wurde daraufhin eine Präparation der Plasmid-DNA in großem Maßstab durchgeführt. Proben dieser Präparation wurden in zwei Sequenzreaktionen untersucht. Diese unterschieden sich durch die Verwendung eines jeweils anderen Primers.

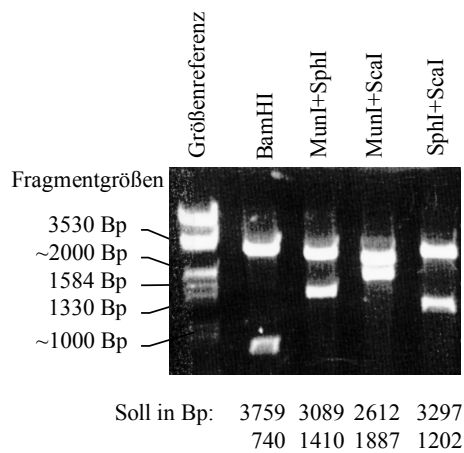
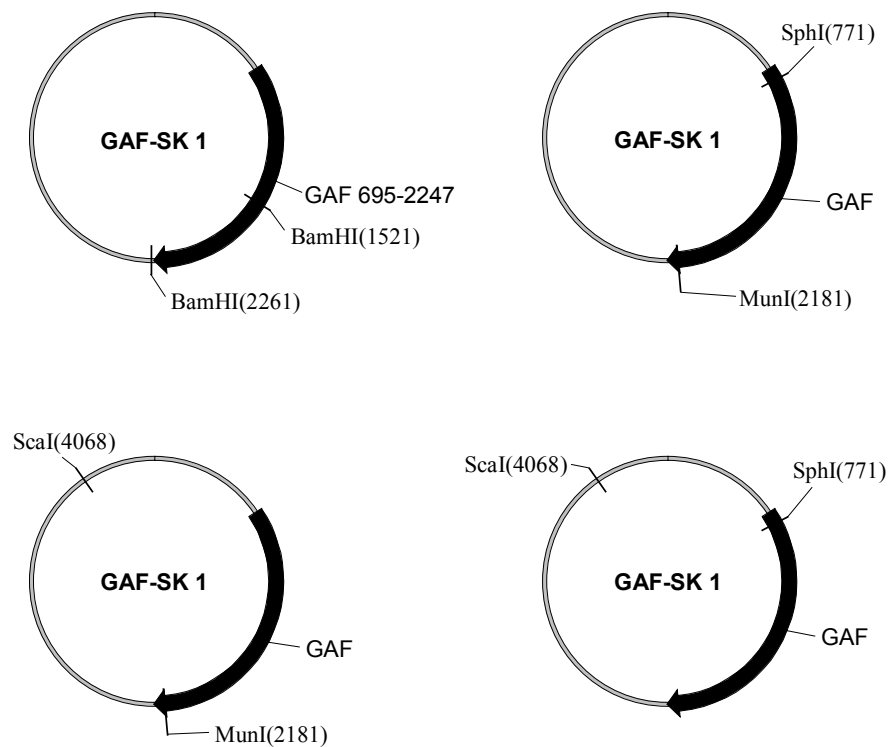


Abbildung 2.11:

Agarosegelelektrophorese von vier Restriktionsspaltungsansätzen mit dem Plasmid GAF-SK 1, die den korrekten Aufbau dieses Plasmids belegen. Es sind jeweils die verwendeten Restriktionsenzyme und die erwarteten Fragmentgrößen angegeben. Der Vergleich mit den Banden der Größenreferenz zeigt die Übereinstimmung der erwarteten mit den gefundenen Größen. Unten sind die Testspaltungen schematisch dargestellt.



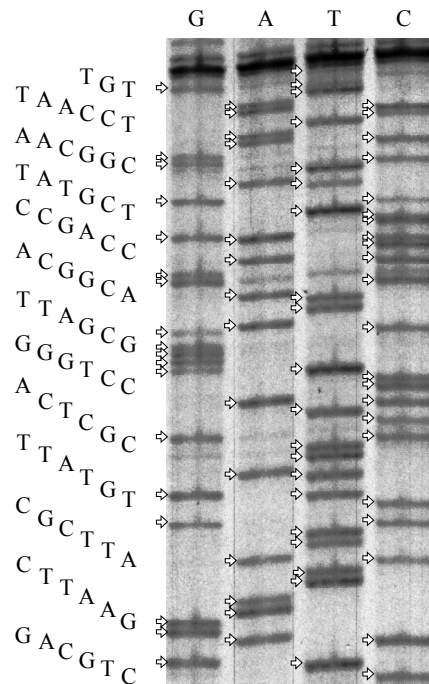


Abbildung 2.12:

Sequenzreaktion mit dem Plasmid GAF-SK 1 im Bereich der Erkennungsstellen für EcoRI bis MunI. Auf der Abbildung der Gelelektrophorese sind die gewerteten Banden mit einem Pfeil markiert. Die daraus resultierende Basensequenz ist in der Orientierung vom Unter- zum Oberrand des Gels angegeben. Der Bereich enthält keine Abweichungen von der Originalsequenz.

		EcoRI						
		┌───────────┐						
		CT	GCA	GGA	ATT	CAT	TCG	CTG
		TAT	TCG	CTC	ACC	TGG	GGC	GAT
		TAC	GGC	ACC	AGC	CTC	GTA	TCG
		GCA	ATC	CAA	TTG	T		
				└───────────┘				
				MunI				

Die Primer waren dabei so gewählt, dass sie die Sequenzreaktion jeweils von der Bluescript-DNA in eines der Enden der *GAF*-Sequenz hinein ablaufen ließen. Bei den Primern handelte es sich um die Primer mit der Bezeichnung T3 und T7. Diese Primer werden standardmäßig für Sequenzreaktionen auf eingefügte Sequenzen in Plasmiden der Bluescript-Familie verwendet.

Die Sequenzreaktion mit dem Primer T3 ermöglichte es, die *GAF*-Sequenz bis zur Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym MunI zu verifizieren (siehe Abbildung 2.12). Die Sequenzreaktion mit dem Primer T7 ermöglichte dies bis zur Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym SphI (siehe Abbildung 2.13). Beide Restriktionsenzyme besitzen in Bluescript-SK⁻ keine und in der *GAF*-Sequenz nur die eben beschriebenen Erkennungsstellen. Dies ermöglichte es, nach Abschluss der Sequenzierung den Abschnitt der *GAF*-Sequenz, welcher zwischen den Erkennungsstellen für MunI und SphI liegt, mit Hilfe dieser Enzyme herauszuschneiden. Aus der ursprünglichen *GAF*-Sequenz wurde ebenfalls ein entsprechendes Fragment herausgeschnitten.

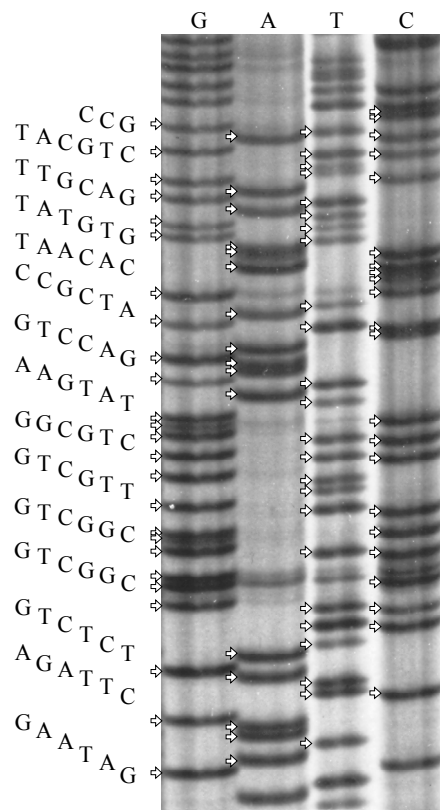


Abbildung 2.13:

Sequenzreaktion mit dem Plasmid GAF-SK 1 im Bereich der Erkennungsstellen für HindIII bis SphI. Auf der Abbildung der Gelelektrophorese sind die gewerteten Banden mit einem Pfeil markiert. Die daraus resultierende Basensequenz ist in der Orientierung vom Unter- zum Oberrand des Gels angegeben. Der Bereich enthält keine Abweichungen von der Originalsequenz.

HindIII			BglII		
GAT	AAG	CTT	AGA	TCT	CTG
CGG	CTG	CGG	CTG	TTG	CTG
CTG	CGG	TAT	GAA	GAC	CTG
ATC	GCC	CAC	AAT	GTG	TAT
GAC	GTT	CTG	CAT	GCC	
SphI					

Da dieses Fragment nicht aus einer Polymerasekettenreaktion stammte, bestand hier keine Gefahr unbeabsichtigter Mutationen. Indem das MunI-SphI-Fragment aus GAF-SK 1 durch dieses ursprüngliche Fragment ersetzt wurde, konnte auf die Sequenzierung eben dieses Abschnittes verzichtet werden. Dies stellte eine wesentliche Vereinfachung des Vorgehens dar.

In der praktischen Durchführung wurde ein Aliquot der Plasmid-DNA von GAF-SK 1 mit den Restriktionsenzymen MunI und SphI behandelt. Auch eine entsprechende Menge der die ursprüngliche *GAF*-Sequenz enthaltenden DNA wurde mit diesen Enzymen gespalten. Die benötigten Fragmente wurden anschließend mittels einer Agarosegelelektrophorese isoliert. Die aufgereinigte DNA konnte dann in einer Ligation zusammengefügt werden. Es wurden zwölf *E. coli*-Klone, welche aus der nachfolgenden Transformation hervorgingen, isoliert.

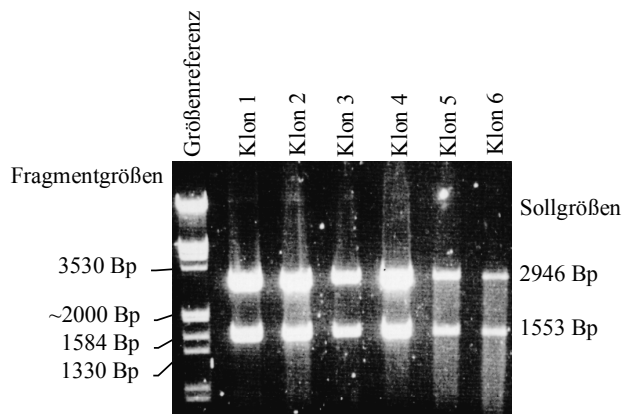
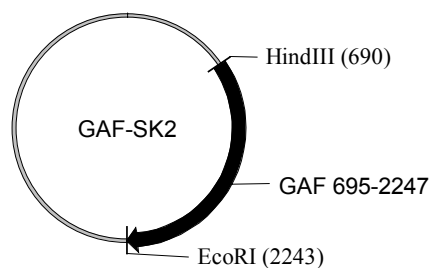


Abbildung 2.14:

Agarosegelelektrophorese von Restriktionsspaltungsansätzen mit sechs Klonen für das Plasmid GAF-SK 2. Es wurden jeweils die Restriktionsenzyme EcoRI mit HindIII verwendet. Die bei korrekten Klonen erwarteten Fragmentgrößen sind angegeben. Der Vergleich mit den Banden der Größenreferenz zeigt für alle Klone die Übereinstimmung der erwarteten mit den gefundenen Größen.



Es wurden auch hier Plasmidpräparationen dieser Klone in kleinem Maßstab durchgeführt. Proben dieser Präparationen wurden anschließend mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und HindIII untersucht. Eine Agarosegelelektrophorese ergab für zehn Klone das korrekte Fragmentmuster (2946 und 1553 Basenpaare; siehe Abbildung 2.14). Einer dieser Klone, er wird als GAF-SK 2 bezeichnet, wurde mit weiteren Restriktionsenzymen überprüft. Eine Agarosegelelektrophorese ergab auch hier die korrekten Fragmentmuster (für BamHI mit BglII: 2934, 825 und 740 Basenpaare; für EcoRI mit BglII: 2952 und 1547 Basespaare; siehe Abbildung 2.15).

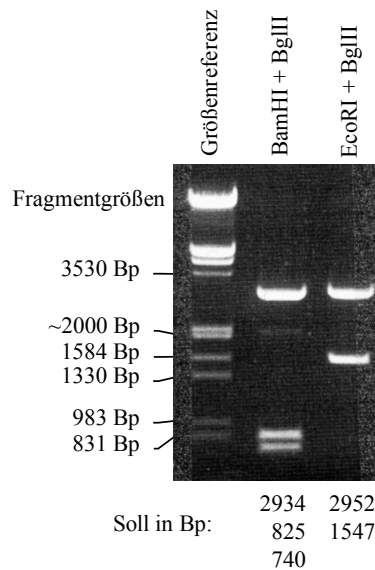
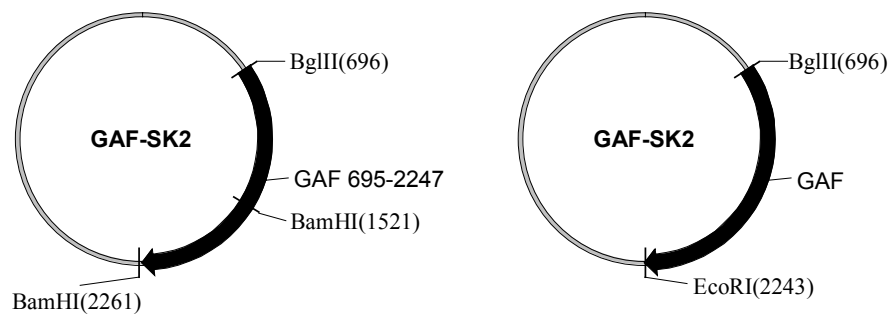


Abbildung 2.15:

Agarosegelelektrophorese von zwei Restriktionsspaltungsansätzen mit dem Plasmid GAF-SK 2, die den korrekten Aufbau dieses Plasmids belegen. Es sind jeweils die verwendeten Restriktionsenzyme und die erwarteten Fragmentgrößen angegeben. Der Vergleich mit den Banden der Größenreferenz zeigt die Übereinstimmung der erwarteten mit den gefundenen Größen.



2.2.4 Einbau der *GAF*-Sequenzen in die Plasmide pP4-12 und pP4-72

Bei den Plasmiden pP4-12 und pP4-72 handelt es sich, wie bei pP4-70, um Plasmide die eine stabile Transformation von *S. cerevisiae* ermöglichen (siehe Abbildung 2.16; pP4-12 wurde als $\Delta 2$ in YCp und pP4-72 wurde als $\Delta 2$ in YEp beschrieben in: Svaren *et al.*, 1994). Dabei besteht der wesentliche Unterschied der Plasmide in dem Abschnitt, der für die Vermehrung und Erhaltung des Plasmids in *S. cerevisiae* zuständig ist. In pP4-12 steuert eine ARS Sequenz die Replikation des Plasmids in Hefen und eine CEN Sequenz bewirkt eine Erhaltung der transformierten Plasmide in einer Kopienzahl von 1 bis 3 Plasmiden in jeder Zelle.

Die 2 μ -Sequenz steuert die Replikation von pP4-72. Sie sorgt für eine stabile Zahl von 20 bis 50 Kopien des Plasmids in jeder Hefezelle.

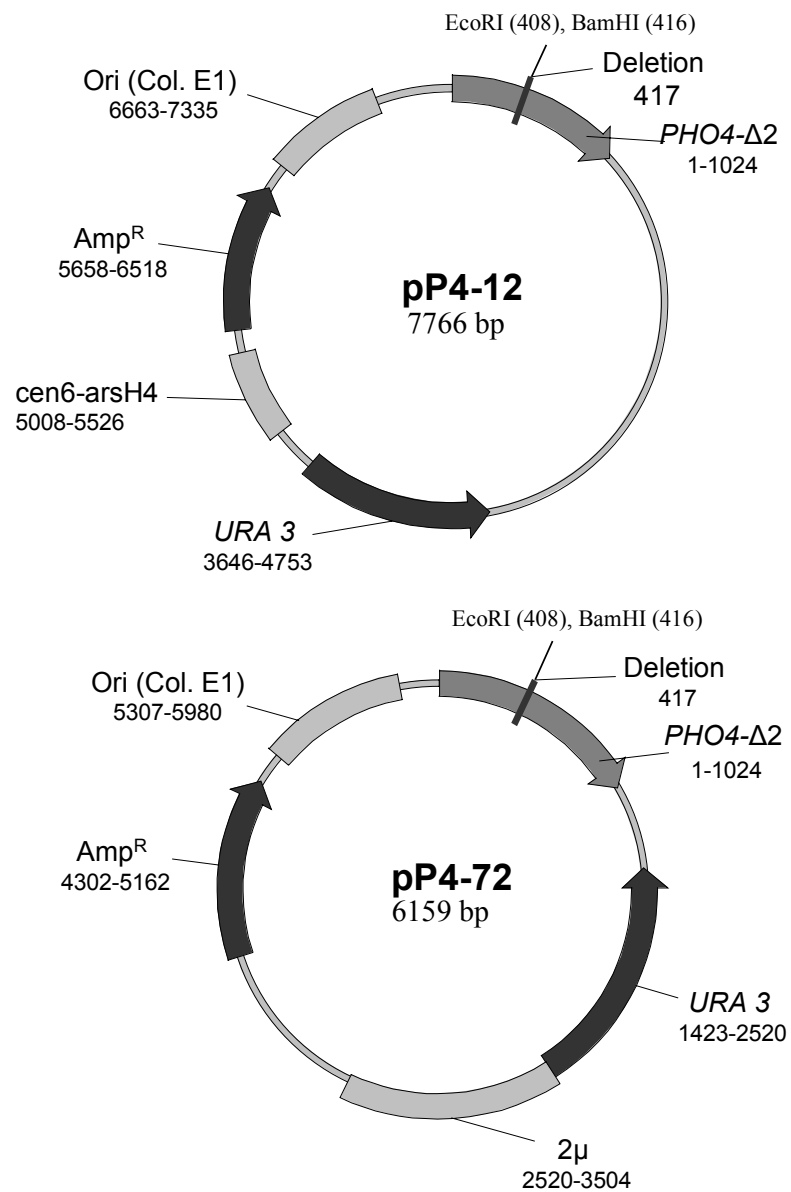


Abbildung 2.16:

Karten der Plasmide pP4-12 und pP4-72. Es finden sich jeweils die wesentlichen funktionellen Elemente mit Angabe ihrer genauen Lokalisation im Plasmid. Beide Plasmide enthalten eine Ampicillinresistenz (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*, sowie das *URA3*-Gen zur Selektion in *S. cerevisiae*. Die Abschnitte 2μ beziehungsweise cen6-arsH4 steuern jeweils die Replikation in *S. cerevisiae*, während Ori (Col. E1) die Replikation in *E. coli* steuert. Beide Plasmide enthalten das *PHO4*-Derivat *PHO4-Δ2*. Die Position der Deletion in *PHO4-Δ2* ist angegeben (vergleiche Abbildung 2.8a). Die Restriktionsschnittstellen von EcoRI und BamHI sind ebenfalls gekennzeichnet.

Gemeinsam ist beiden Plasmiden ein Replikationsursprung für die Vermehrung in *E. coli*. Sie kodieren außerdem für eine Ampicillinresistenz zur Selektion in *E. coli* und enthalten das *URA3*-Gen als Selektionsmarker in *S. cerevisiae*-Stämmen, denen ein funktionelles *URA3*-Gen fehlt.

Entscheidend für die hier durchgeführten Experimente ist aber, dass diese Plasmide ein *PHO4*-Derivat unter transkriptioneller Kontrolle des natürlichen *PHO4*-Promotors enthalten. Das *PHO4*-Derivat unterscheidet sich vom Wildtyp-*PHO4* durch eine Deletion der Codons für die Aminosäuren 12 bis 151 des Wildtypproteins. Dabei wurden zusätzlich je eine Erkennungsstelle für die Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI in die Sequenz eingeführt. Die zur Einführung der Schnittstellen notwendigen Veränderungen der Originalsequenz, hatten als konservative Mutationen aber keine weitere Auswirkung auf die Aminosäuresequenz des Proteins (siehe Abbildung 2.8a).

Sowohl die Erkennungsstelle für EcoRI als auch für BamHI wurden für den Einbau der *GAF*-Sequenz benötigt. Um die gesamte *GAF*-Sequenz hier einzufügen, wurden die dort mit Hilfe der PCR erzeugten Schnittstellen EcoRI und BglII verwendet (siehe Abbildung 2.8b). Voraussetzung dafür war die Kompatibilität der Schnittstellen BamHI und BglII. Diese lassen sich, allerdings unter wechselseitiger Zerstörung der Erkennungssequenz, wie zwei gleichartige Schnittstellen verbinden. Zweite Voraussetzung für die Verwendung dieser Schnittstellen war der Erhalt des Leserasters der Translation. Das Konstrukt bewirkt dann die Expression des nachfolgend dargestellten chimären Proteins (siehe Abbildung 2.8b).

Am N-Terminus dieses Proteins befinden sich die ersten zehn Aminosäuren des Pho4-Proteins. Diese wurden beibehalten, um die Umgebung des Translationsstarts zu erhalten und damit Effekte auf der Translationsebene auszuschließen. Hierauf folgen die Aminosäuren 7 bis 519 des *GAF*. Daran schließen sich die Aminosäuren 152 bis 312 des Pho4 Proteins an. Zwischen dem letzten Codon der *GAF*-Sequenz und dem Codon 152 der *PHO4*-Sequenz entstand dabei unvermeidlich ein zusätzliches Codon für die Aminosäure Arginin. Der auf den *GAF* folgende Abschnitt des Pho4-Proteins enthält neben der DNA-bindenden Domäne auch noch die Pho2-Interaktions-Domäne des Wildtyp-Pho4. Das gesamte Protein besteht damit aus 685 Aminosäuren (siehe Abbildung 2.8b).

Die Pho2-Interaktions-Domäne wurde in die chimären Moleküle aufgrund von Beobachtungen mit in früheren Experimente hergestellten chimären Pho4-Proteinen

einbezogen. Diese Untersuchungen betrafen zwei Konstrukte mit der transaktivierenden Domäne von VP16 und jeweils nur der DNA-bindenden Domäne von Pho4 sowie der Pho2-Interaktions-Domäne zusammen mit der DNA-bindenden Domäne von Pho4 (Svaren *et al.*, 1994). Nur das Konstrukt mit dem längeren Pho4-Anteil zeigte signifikante Aktivität am *PHO5*-Promotor. Es gibt zwei mögliche Erklärungen für die Inaktivität des Konstruktes mit dem kurzen Pho4-Anteil. Einerseits könnte eine sterische Behinderung der DNA-Bindung oder Transaktivierung durch die Nähe der DNA-bindenden und transaktivierenden Domänen vorliegen. Andererseits könnte die wesentliche Beteiligung von Pho2 an der Bindung von Pho4 an UASp1, vermittelt durch die Pho2-Interaktions-Domäne, für die Inaktivität verantwortlich sein. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit nur eine um die Pho2-Interaktions-Domäne erweiterte, DNA-bindende Domäne verwendet. Diese soll hier, um die Übersichtlichkeit zu bewahren, im Zusammenhang mit den Konstrukten nur als DNA-bindende Domäne von Pho4 bezeichnet werden.

Die in der originären *GAF*-Sequenz bereits vorliegende Erkennungsstelle für BamHI, welche ungefähr in der Mitte der Sequenz liegt, ermöglichte es auch, jeweils nur eine Hälfte der *GAF*-Sequenz in die Expressionsplasmide einzufügen. Auch hier war die Voraussetzung erfüllt, dass das Leseraster durch die Verwendung dieser Schnittstelle nicht verschoben würde (siehe Abbildung 2.8c und 2.8d). Um nun die erste Hälfte der *GAF*-Sequenz in die Expressionsplasmide einzubauen, konnten die Schnittstellen EcoRI und BamHI verwendet werden. Für die zweite Hälfte wurden die Schnittstellen BamHI und BglII verwendet, wobei hier im Expressionsplasmid nur die Schnittstelle BamHI benötigt wurde. Die mit Hilfe dieser Konstrukte exprimierten chimären Proteine hatten folgende Struktur:

Das Konstrukt mit der ersten Hälfte von *GAF* besteht aus den ersten zehn Aminosäuren des Pho4-Proteins (siehe Abbildung 2.8c). Hierauf folgen die Aminosäuren 7 bis 245 des *GAF*. Daran schließen sich die Aminosäuren 152 bis 312 des Pho4-Proteins an. Das gesamte Protein besteht aus 410 Aminosäuren.

Das Konstrukt mit der zweiten Hälfte des *GAF* setzt sich zusammen aus den ersten zehn Aminosäuren des Pho4-Proteins, gefolgt von den Aminosäuren 245 bis 519 des *GAF* (siehe Abbildung 2.8d). Daran schließen sich die Aminosäuren 152 bis 312 des Pho4-Proteins an. Zwischen dem letzten Codon der *GAF*-Sequenz und dem Codon 152 der *PHO4*-Sequenz entstand auch hier ein zusätzliches Codon für die Aminosäure Arginin. Das resultierende Protein besteht demzufolge aus 447 Aminosäuren.

Um die Konstrukte zusammenfügen zu können, wurden beide Expressionsplasmide mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI sowie auch mit BamHI alleine gespalten. Nach einer Isolierung mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender Aufreinigung der Fragmente konnte die mit EcoRI und BamHI gespaltene DNA sofort verwendet werden. Die ausschließlich mit BamHI gespaltenen Plasmide wurden vorher noch mit einer Phosphatase dephosphoryliert. Dies war sinnvoll, da ein Plasmid, welches mit nur einem Restriktionsenzym gespalten wird, sich in einer Ligierung bevorzugt, ohne den Einbau des einzufügenden Fragments, rezirkularisiert. Diese Reaktion wird durch die Dephosphorylierung der Fragmentenden des Plasmids verhindert. Dieses kann sich dann nur noch stabil mit einem zweiten, nicht dephosphorylierten Fragment verbinden.

Die Plasmid-DNA von GAF-SK 2 wurde mit EcoRI und BglII sowie mit EcoRI, BamHI und BglII inkubiert. In der ersten Reaktion wurde die gesamte *GAF*-Sequenz aus dem Plasmid herausgeschnitten. In der zweiten Reaktion wurde dieses Fragment durch das zusätzliche Restriktionsenzym BamHI in zwei weitere Fragmente mit geringem Größenunterschied gespalten. Die drei Fragmente wurden anschließend in einer Agarosegelelektrophorese isoliert und aufgereinigt. Es handelt sich zusammenfassend um folgende Fragmente: Eines, welches die gesamte *GAF*-Sequenz enthält und mit EcoRI und BglII geschnitten worden war. Dieses erhielt die Bezeichnung GAF1. Das zweite Fragment entspricht der ersten Hälfte der *GAF* Sequenz und war mit den Enzymen EcoRI und BamHI geschnitten worden. Es erhielt die Bezeichnung GAF2. Das dritte Fragment, GAF3, entspricht schließlich der zweiten Hälfte der *GAF*-Sequenz. Es war mit BamHI und BglII geschnitten worden.

Die Fragmente GAF1 und GAF2 konnten zusammen mit den mit EcoRI und BamHI geschnittenen Plasmiden pP4-12 und pP4-72 in eine Ligierung eingesetzt werden (siehe Abbildung 2.8b und 2.8c). Hier ist anzumerken, dass die Enzyme BamHI und BglII kompatible Fragmentenden erzeugen, welche sich unter Zerstörung beider Erkennungssequenzen in einer Ligierung verbinden können. Die daraus entstandenen Plasmide wurden als pP4-12-GAF1, pP4-12-GAF2, pP4-72-GAF1 und pP4-72-GAF2 bezeichnet.

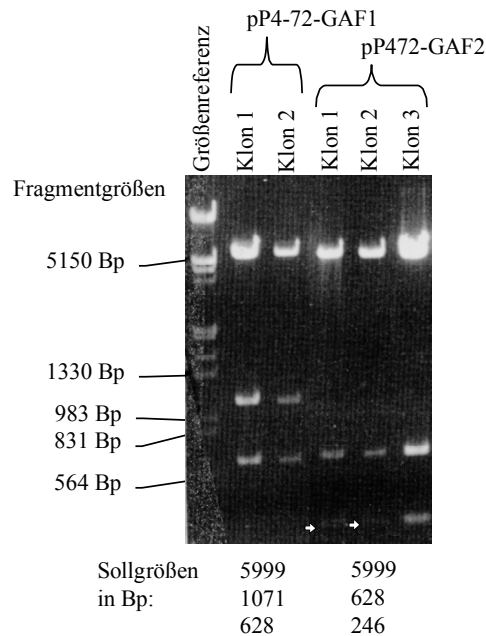
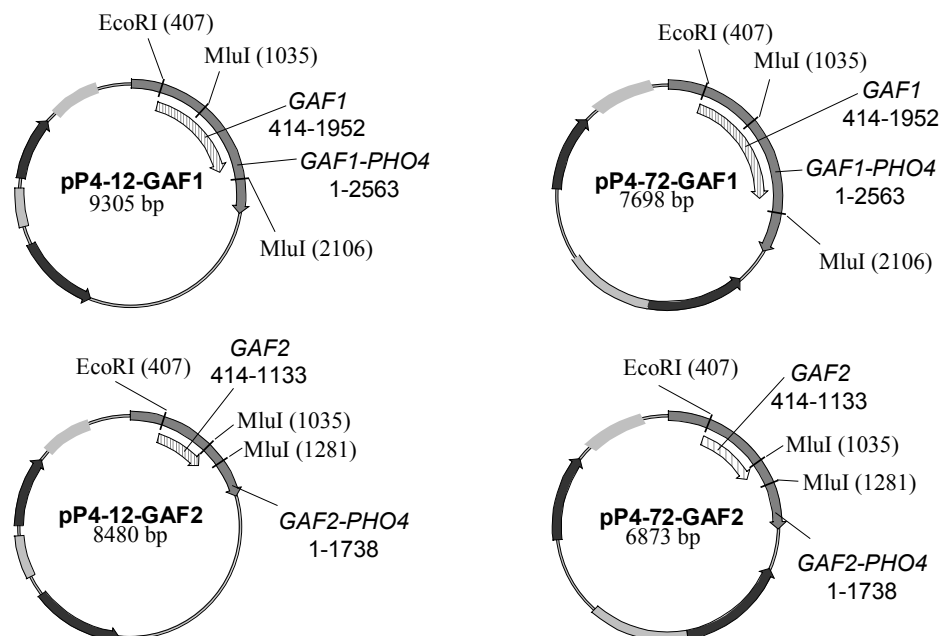


Abbildung 2.17:

Tabellarisch sind die erwarteten Fragmentgrößen für die Konstrukte mit der GAF1- und GAF2-Sequenz nach Spaltung mit den Restriktionsenzymen EcoRI mit MluI angegeben. Schemazeichnungen (vergleiche Abbildung 2.16) zeigen die Positionen der Schnittstellen in den Plasmiden. Exemplarisch wird hier die Agarosegelelektrophorese von Restriktionsspaltungsansätzen mit zwei Klonen für das Plasmid pP4-72-GAF1 und mit drei Klonen für das Plasmid pP4-72-GAF2 gezeigt. Der Vergleich mit den Fragmenten der Größenreferenz zeigt für jeden Klon eine Übereinstimmung der erwarteten mit den gefundenen Größen (Die Positionen zweier Banden, welche abbildungstechnisch bedingt nicht mehr zu erkennen sind, sind durch Pfeile markiert).

Konstrukt	pP4-12-GAF1	pP4-12-GAF2	pP4-72-GAF1	pP4-72-GAF2
Fragmentgrößen				
EcoRI mit MluI	7606+1071+628	7606+628+246	5999+1071+628	5999+628+246



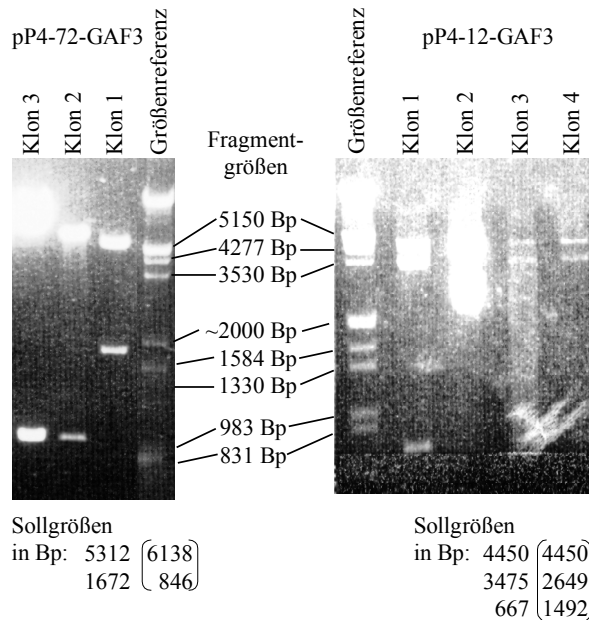
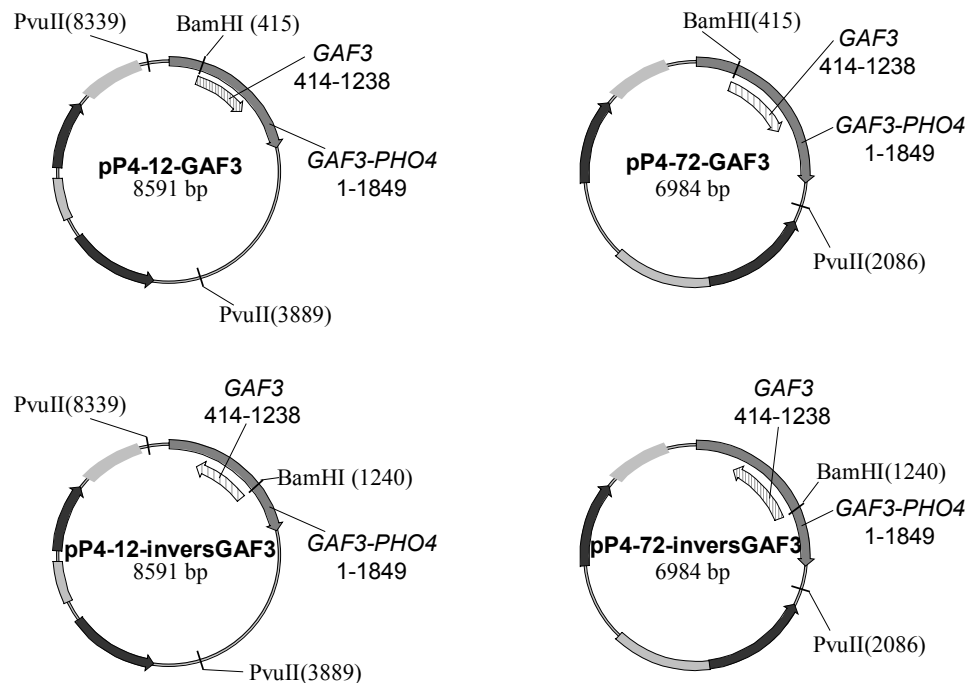


Abbildung 2.18:

Agarosegelelektrophorese von Restriktionsspaltungsansätzen mit drei Klonen für das Plasmid pP4-72-GAF3 und mit vier Klonen für das Plasmid pP4-12-GAF3. Es wurden jeweils die Restriktionsenzyme BamHI mit PvuII verwendet. Die bei korrekten Klonen erwarteten Fragmentgrößen sind angegeben (in Klammern sind die Fragmentgrößen bei inversem Einbau der GAF3-Sequenz angegeben). Schemata (vergleiche Abbildung 2.16) zeigen die Lokalisation der Restriktionsschnittstellen in der Plasmidsequenz. Zudem sind Schematisch die Verhältnisse bei inversem Einbau der GAF3-Sequenz dargestellt. Der Vergleich mit den Fragmenten der Größenreferenz zeigt jeweils für den Klon 1 eine Übereinstimmung der erwarteten mit den gefundenen Größen



Das dritte Fragment, GAF3, wurde zusammen mit den mit BamHI geschnittenen und dephosphorylierten Plasmiden pP4-12 und pP4-72 in eine Ligierung eingesetzt (siehe Abbildung 2.8d). Auch diese Reaktion wurde durch die Kompatibilität zwischen BamHI und BglII ermöglicht. Dadurch entstand aber auch das Problem, dass die Orientierung des eingefügten Fragments nicht mehr durch die verschiedenen Schnittstellen an den Enden des Fragments vorgegeben war. Stattdessen konnte sich das Fragment in beiden Orientierungen in das Plasmid einfügen. Die hier erzeugten Plasmide wurden als pP4-12-GAF3 und pP4-72-GAF3 bezeichnet.

Damit ist in pP4-12-GAF1 und pP4-72-GAF1 die kodierende Sequenz für den kompletten GAF, in pP4-12-GAF2 und pP4-72-GAF2 die kodierende Sequenz für die 5'-Hälfte des GAF und in pP4-12-GAF3 und pP4-72-GAF3 die kodierende Sequenz für die 3'-Hälfte des GAF, jeweils verbunden mit der DNA-bindende Domäne von Pho4, enthalten (siehe Abbildung 2.8).

Die ligierten Plasmide wurden in *E. coli* transformiert. Für jedes Konstrukt konnten Klone isoliert werden. Auch hier wurden in kleinem Maßstab Plasmidpräparationen von mehreren Klonen eines jeden transformierten Konstrukts durchgeführt. Diese Präparationen wurden mittels Ermittlung der Fragmentgrößen nach Spaltung mit geeigneten Restriktionsenzymen überprüft. Proben der Plasmidpräparationen pP4-12-GAF1, pP4-12-GAF2, pP4-72-GAF1 und pP4-72-GAF2 wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRI und MluI inkubiert. Es fanden sich für alle Konstrukte Klone mit dem korrekten Fragmentmuster. (Die erwarteten Fragmentgrößen sind zusammen mit dem exemplarischen Bild einer Gelelektrophorese in Abbildung 2.17 angegeben.) Proben der Plasmidpräparationen pP4-12-GAF3 und pP4-72-GAF3 wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und PvuII gespalten (Auch hier sind die erwarteten Fragmentgrößen in Abbildung 2.18 angegeben). Die Enzyme BamHI und PvuII wurden auch unter dem Aspekt ausgewählt, dass die resultierenden Fragmentgrößen eindeutig Aufschluß über die Orientierung des eingefügten Fragments geben würden. Auch hier fanden sich jeweils einige Klone mit dem richtigen Konstrukt.

Anschließend wurde für jedes Plasmid ein Klon mittels weiterer Restriktionsenzyme untersucht, um den korrekten Aufbau zu bestätigen. pP4-12-GAF1, pP4-12-GAF2, pP4-72-GAF1 und pP4-72-GAF2 wurden jeweils mit den Enzymen NcoI, PvuII und BamHI mit StuI gespalten. Für die überprüften Klone gelang der Nachweis der kor-

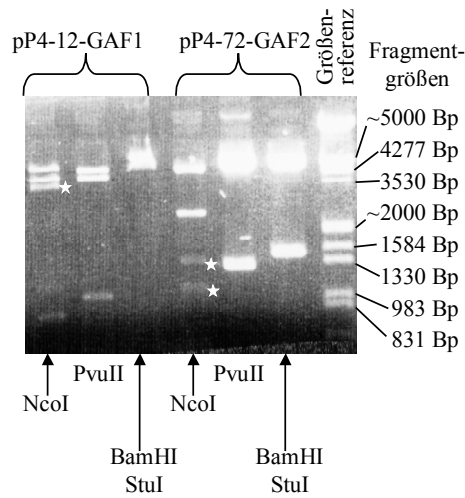
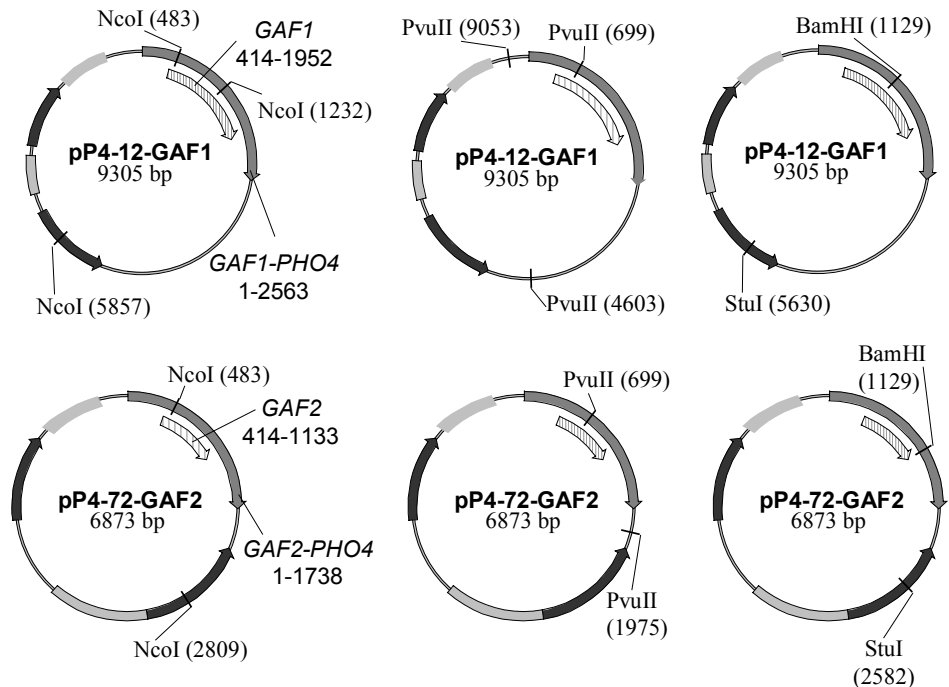


Abbildung 2.19a:

Agarosegelelektrophorese von je drei Restriktionsspaltungsansätzen mit den Plasmiden pP4-12-GAF1 und pP4-72-GAF2, die den korrekten Aufbau dieser Plasmide belegen. Es sind jeweils die verwendeten Restriktionsenzyme angegeben. Die erwarteten Fragmentgrößen sind tabellarisch aufgeführt. Aus den Schemazeichnungen ist die Position der Restriktionsschnittstellen in den Plasmiden zu ersehen. In der Elektrophorese zeigt der Vergleich mit den Fragmenten der Größenreferenz die Übereinstimmung der erwarteten mit den gefundenen Fragmentgrößen (Fragmente die durch partielle, unspezifische Spaltung der DNA entstanden sind, sind durch Sterne gekennzeichnet).

Konstrukt	Nco	PvuII	BamHI mit StuI
pP4-12-GAF1	4625+3932+749	4450+3904+951	4804+4501
pP4-72-GAF2	4547+2326	5597+1276	5420+1453



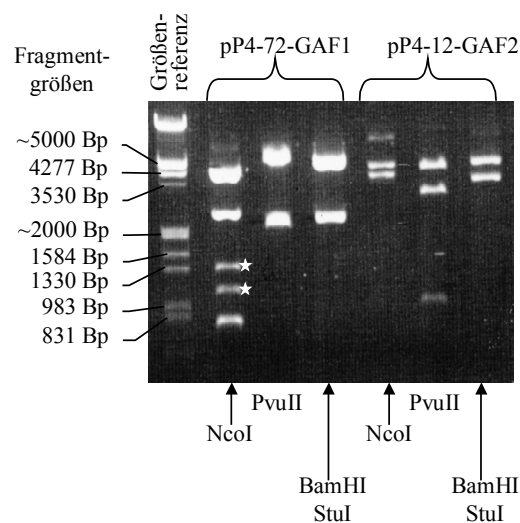
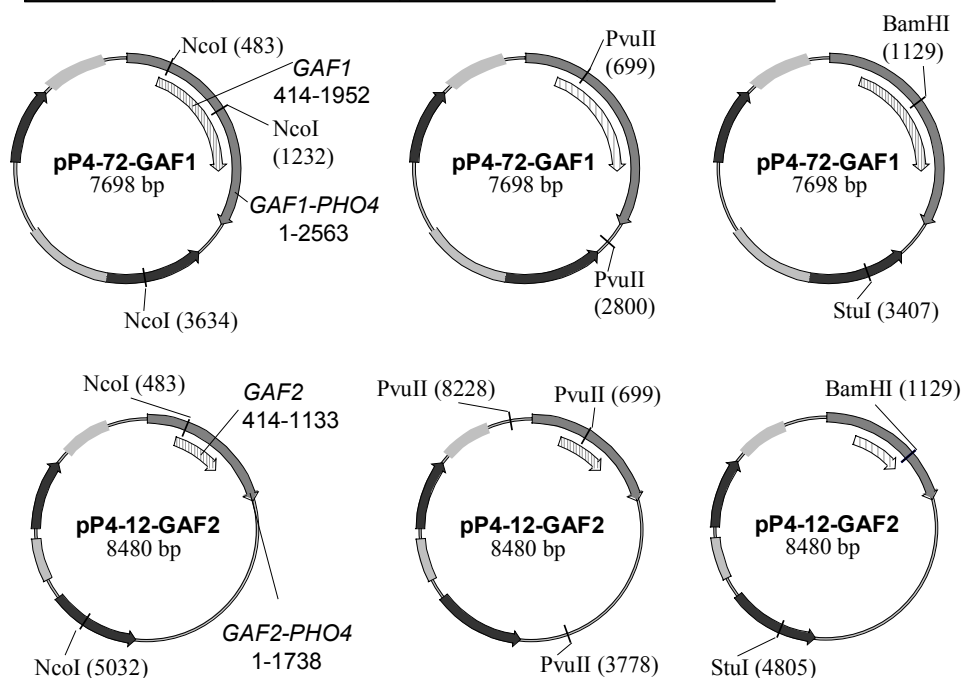


Abbildung 2.19b:

Agarosegelelektrophorese von je drei Restriktionsspaltungsansätzen mit den Plasmiden pP4-72-GAF1 und pP4-12-GAF2, die den korrekten Aufbau dieser Plasmide belegen. Es sind jeweils die verwendeten Restriktionsenzyme angegeben. Die erwarteten Fragmentgrößen sind tabellarisch aufgeführt. Aus den Schemazeichnungen ist die Position der Restriktionsschnittstellen in den Plasmiden zu ersehen. In der Elektrophorese zeigt der Vergleich mit den Fragmenten der Größenreferenz die Übereinstimmung der erwarteten mit den gefundenen Größen (Fragmente die durch partielle, unspezifische Spaltung der DNA entstanden sind, sind durch Sterne gekennzeichnet).

Konstrukt	Nco	PvuII	BamHI mit StuI
pP4-72-GAF1	4547+2402+749	5597+2101	5420+2278
pP4-12-GAF2	4549+3932	4450+3079+951	4804+3676



rekten Fragmente in der Agarosegelelektrophorese (siehe Abbildung 2.19a und 2.19b).

Die Proben jeweils eines Klons von pP4-12-GAF3 und pP4-72-GAF3 wurden durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen EcoRV mit HindIII und ScaI beziehungsweise ScaI mit ClaI überprüft.

Sowohl für pP4-12-GAF3 (EcoRV mit HindIII: 4205, 3429 und 957 Basenpaare; ScaI: 3807, 2375, 1750 und 659 Basenpaare) als auch für pP4-72-GAF3 (EcoRV mit HindIII: 4045, 1982 und 957 Basenpaare; ScaI mit ClaI: 3131, 2617 und 1236 Basenpaare; siehe Abbildung 2.20) ergab sich das erwartete Fragmentmuster. Damit stand von allen sechs Konstrukten die Plasmidpräparation eines verifizierten Klons zur Verfügung.

2.2.5 Transformation der *GAF-PHO4* Konstrukte in *Saccharomyces cerevisiae*

YS33 wurde mit den Plasmiden pP4-12-GAF1, pP4-12-GAF2, pP4-12-GAF3, pP4-72-GAF1, pP4-72-GAF2 und pP4-72-GAF3 transformiert. Die Eigenschaften von YS33 wurden bereits beschrieben. Auch hier ist von Bedeutung, dass YS33 kein funktionelles *PHO4*-Gen besitzt. Das Fehlen dieses Gens ermöglicht es, die Eigenschaften der Fusionsproteine ohne Störung durch das Wildtyp-Pho4 zu untersuchen. YS33 ist auch defizient für Pho80. Wie bereits beschrieben, hemmt Pho80 die Aktivität von Pho4 bei ausreichender Phosphatversorgung. Diese Interaktion könnte bei den chimären Proteinen in unvorhersehbarer Weise verändert sein. Damit stellt das Fehlen von Pho80 in YS33 ebenfalls einen Vorteil für die beabsichtigten Experimente dar.

Nach der Transformation konnten mittels Kultivierung auf Uracil-Mangelmedien erfolgreich transformierte Zellen kloniert werden. Es wurden jeweils drei Klone für weitere Untersuchungen ausgewählt.

2.2.6 Nachweis von Plasmid-DNA in Transformanten mittels Southern-Blot

Um den grundsätzlichen Erfolg der Transformation der Konstrukte in *S. cerevisiae* zu belegen, wurden DNA-Präparationen von den klonierten Transformanten angefertigt. Diese wurden dann in einem Southern Blot mit einer für das transformierte Plasmid spezifischen DNA-Sonde untersucht.

Um Material für die DNA-Präparationen zu erhalten, wurden jeweils drei Klone von pP4-72-GAF1 und pP4-72-GAF2 in *S. cerevisiae* in kleinem Maßstab in flüssigem

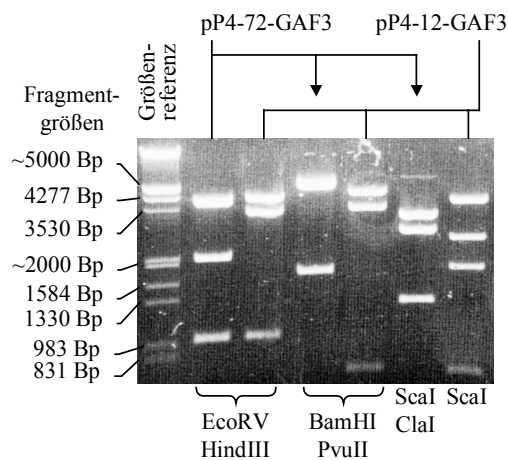


Abbildung 2.20:

Agarosegelelektrophorese von je drei Restriktionsspaltungsansätzen mit den Plasmiden pP4-12-GAF3 und pP4-72-GAF3. Es sind jeweils die verwendeten Restriktionsenzyme angegeben. Die erwarteten Fragmentgrößen sind:

für pP4-12-GAF3:

EcoRV+HindIII: 4205, 3429, 957 Bp

BamHI+PvuII: 4450, 3474, 667 Bp

ScaI: 3807, 2375, 1750, 659 Bp

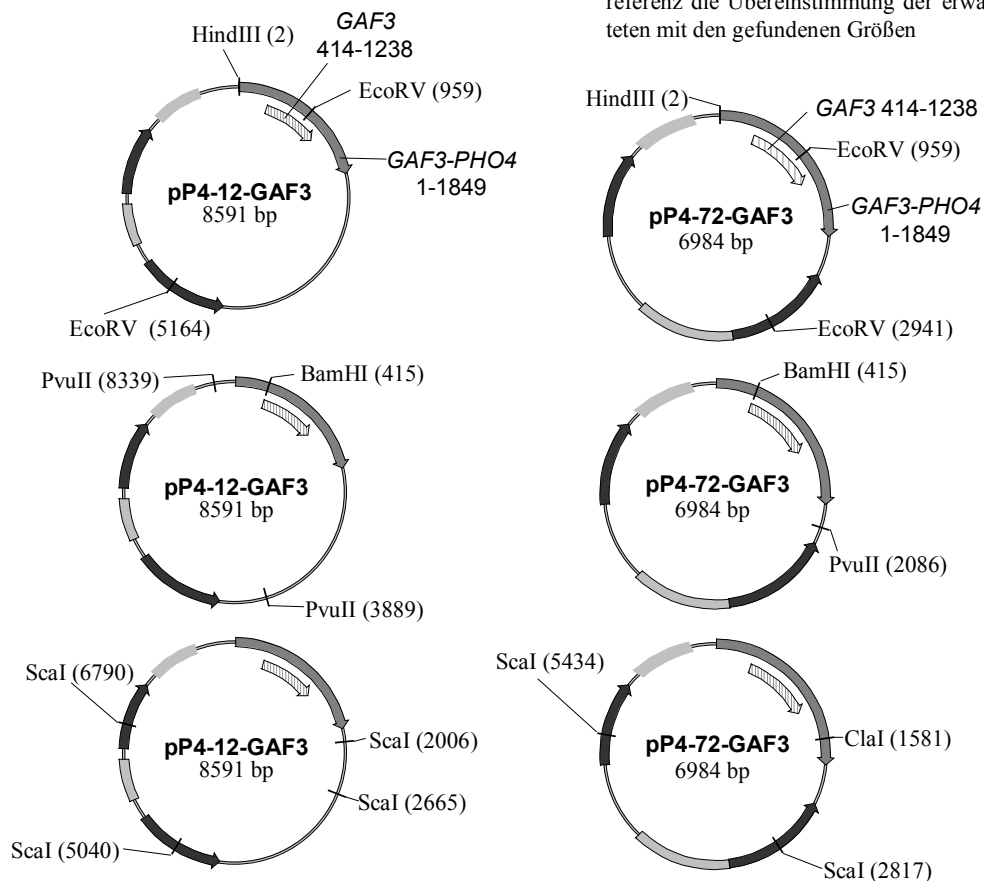
für pP4-72-GAF3:

EcoRV+HindIII: 4045, 1982, 957 Bp

BamHI+PvuII: 5313, 1671 Bp

ScaI+ClaI: 3131, 2617, 1236 Bp

Schemazeichnungen zeigen die Positionen der Restriktionsschnittstellen in den Plasmiden. In der Elektrophorese zeigt der Vergleich mit den Banden der Größenreferenz die Übereinstimmung der erwarteten mit den gefundenen Größen



Medium kultiviert. Die Hefezellen wurden beim Erreichen der geeigneten Wachstumsdichte enzymatisch lysiert. Die in den Lysaten enthaltene DNA wurde dann aufgereinigt. In diesen Proben ist sowohl die Plasmid-DNA als auch die genomische DNA der Hefezellen enthalten.

Damit sind die Plasmide nicht wie bei Plasmid-Präparationen aus *E. coli* einfach durch unspezifische Anfärbung in einer Agarosegelelektrophorese nachweisbar. Um das Vorhandensein der korrekten Plasmide zu belegen, muß statt dessen ein *Southern-Blot* durchgeführt werden.

Die DNA-Präparationen der transformierten Hefen wurden nach ihrer Aufreinigung mit geeigneten Restriktionsenzymen gespalten. Diese Restriktionsenzyme wurden so gewählt, dass die im Southern-Blot nachweisbaren Fragmente aussagekräftig bezüglich der für das chimäre Protein kodierenden Sequenz sein würden (siehe Abbildung 2.21). Die DNA-Präparationen wurden zum einen mit den Enzymen HindIII und ClaI, zum anderen mit HindIII und BstEII gespalten. Das im Blot nachweisbare Fragment aus der Spaltung mit HindIII und ClaI entspräche damit einem Teil des Plasmids vom *PHO4*-Promotor, über die jeweilige *GAF*-Sequenz, bis in den Abschnitt der DNA-bindenden Domäne von Pho4. Damit wäre die Größe dieses Fragments auch abhängig von der Länge der enthaltenen *GAF*-Sequenz. Diese ist natürlich für pP4-72-GAF1 und pP4-72-GAF2 verschieden. Das Fragment aus der Spaltung mit HindIII und BstEII entspräche nur dem *PHO4*-Promotor und dem vorderen Viertel der *GAF*-Sequenz. Damit wäre die Größe dieses Fragments zwar nicht abhängig von der Länge der eingefügten *GAF*-Sequenz. Das Fragment würde aber das Vorhandensein der in der *GAF*-Sequenz liegenden BstEII-Schnittstelle nachweisen. Als Kontrollen wurden Plasmid-Präparationen der entsprechenden Konstrukte aus *E. coli* mitgeführt.

Nach einer Aufreinigung der gespaltenen DNA wurde diese in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde die DNA mit Hilfe eines Blot-Verfahrens auf eine Nylonmembran überführt, denaturiert und dann durch Erhitzen fixiert.

Um die Plasmid-DNA nachweisen zu können, mußte eine markierte, spezifische DNA-Sonde hergestellt werden, die eine Differenzierung zwischen der im Überschuß vorhandenen genomischen DNA der Hefe und der Plasmid-DNA ermöglicht. Dazu wurde eine entsprechende Menge des bereits beschriebenen Plasmids pP4-70 mit den Restriktionsenzymen HindIII und XbaI inkubiert. Es resultierten zwei

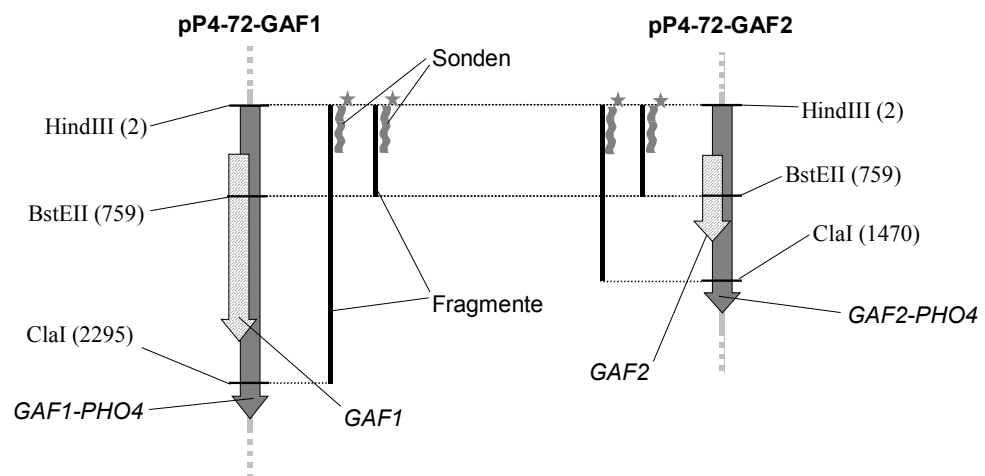
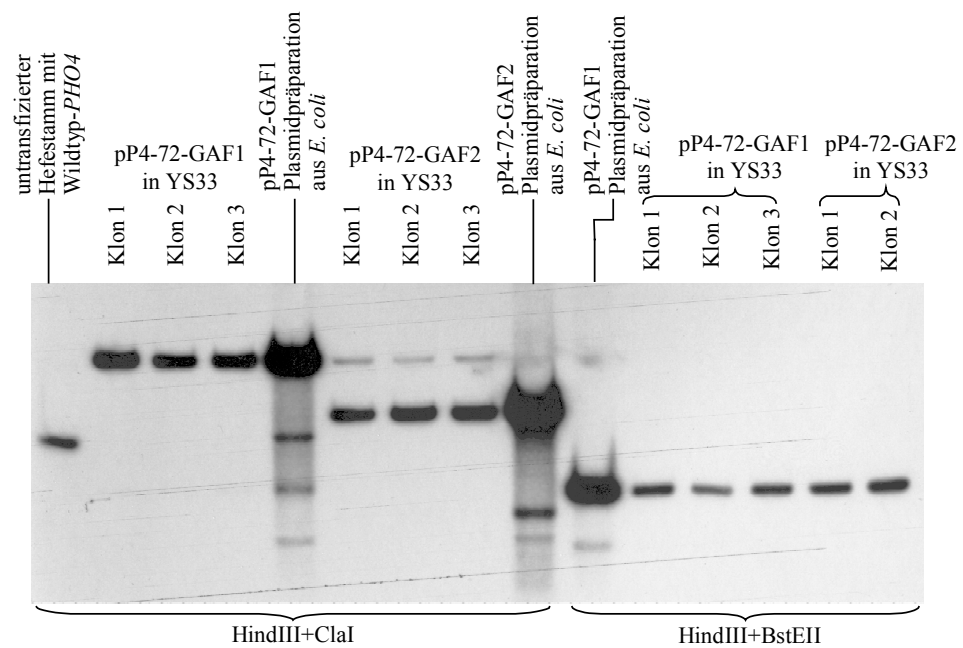


Abbildung 2.21:

Southern-Blot zum Nachweis der Plasmide pP4-72-GAF1 und pP4-72-GAF2 in den transferten Hefen. Die DNA-Präparationen wurden vor der Auftrennung mit den angegebenen Restriktionsenzymen behandelt.

Zum Vergleich wurden entsprechende Plasmid-Präparationen aus *E. coli* mitgeführt. Die ebenfalls mitgeführte DNA-Präparation eines nicht-transformierten Hefestammes mit einem genomischen Wildtyp-*PHO4* gibt die Bandengröße für das Wildtyp-*PHO4* vor. Es wurden für beide Konstrukte jeweils mehrere Klone untersucht. Die Schemazeichnungen zeigen einen Ausschnitt der Plasmide. Sie demonstrieren die Lage der verwendeten Restriktionsschnittstellen in den Konstrukten und zeigen einen Größenvergleich der Fragmente (durchbrochene Linien). Die radioaktiv markierten Sonden weisen durch Bindung an ihre komplementären Sequenzen einen Teil der *PHO4*-Sequenz in den Fragmenten der Konstrukte spezifisch nach. Die Spaltung mit HindIII und ClaI gibt dabei Auskunft über die Größe der in die *PHO4*-Sequenz eingefügten Sequenz und ermöglicht so die Unterscheidung von GAF1- und GAF2-Konstrukten. Die Spaltung mit HindIII und BstEII weist die BstEII-Erkennungsstelle in der *GAF*-Sequenz nach.

Fragmente, von denen das kleinere Fragment mit einer Größe von 427 Basenpaaren in einer anschließenden Agarosegelelektrophorese isoliert wurde. Dieses Fragment weist über etwa 400 Basenpaare eine mit den nachzuweisenden Fragmenten der Konstrukte identische Nukleotidsequenz auf, ist aber nicht in genomischer DNA enthalten.

Das isolierte Fragment von pP4-70 wurde aufgereinigt und diente als Matrize in einem als *Random primed labeling* bezeichneten Verfahren. In diesem Verfahren werden in einem Reaktionsansatz unspezifische Primer zusammen mit einer DNA-Polymerase der Matrize zugesetzt. Die Polymerase synthetisiert dann aus ebenfalls zugesetzten, radioaktiv markierten Nukleosidtriphosphaten radioaktiv markierte Kopien der eingesetzten Matrize. Der Reaktionsansatz wird schließlich durch eine Gelfiltration aufgetrennt. So kann die entstandene, radioaktiv markierte Sonde isoliert werden. Überschüssige, radioaktive Nukleosidtriphosphate werden dabei abgetrennt.

Die mittels des pP4-70-Fragments in dieser Weise hergestellte, radioaktive Sonde wurde mit der Nylonmembran inkubiert, auf der die DNA-Proben fixiert waren. Die Sonde hybridisierte unter entsprechenden Reaktionsbedingungen spezifisch mit den nachzuweisenden DNA-Fragmenten der Proben. Nachdem durch Reinigungsschritte der ungebundene Anteil der Sonde entfernt worden war, konnten Röntgenfilme mit dem Blot exponiert werden. Das auf den Filmen sichtbare Bandenmuster von Hefe-DNA-Präparationen und Plasmid-Präparationen aus *E. coli* konnte nun verglichen werden. Die dabei gefundene Übereinstimmung demonstrierte die erfolgreiche

Transformation der getesteten Hefe-Klone mit den entsprechenden Konstrukten (siehe Abbildung 2.21).

2.2.7 Bestimmung der Aktivität der chimären Proteine durch Messung der Phosphataseaktivität

Da nun belegt war, dass die transformierten Hefen die entsprechenden Plasmide enthielten, konnte als Nächstes untersucht werden, inwieweit die chimären Proteine in der Lage sein würden, die Transkription am *PHO5*-Promotor zu aktivieren. Dazu wurde zunächst die Phosphataseaktivität der Hefezellen von mehreren Klonen eines jeden Konstrukts untersucht. Diese Aktivität wurde sowohl unter Kulturbedingungen mit ausreichender Phosphatversorgung der Zellen, als auch unter Phosphatmangel, dies bedeutet unter induzierenden Bedingungen, bestimmt. Zum Vergleich wurde auch die Aktivität von untransformierten Zellen der Stämme YS31 und YS33 unter beiden Kulturbedingungen gemessen. YS31 besitzt im Gegensatz zu YS33 noch ein funktionelles *PHO4*-Gen und bildet damit eine Positiv-Kontrolle. Bei YS33 fehlt *Pho4*. Mit diesem Stamm kann deshalb die Hintergrund-Phosphataseaktivität bestimmt werden.

Es zeigte sich, dass die Konstrukte pP4-12-GAF1 und pP4-72-GAF1 nicht in der Lage waren, die Transkription am *PHO5*-Promotor zu aktivieren. Die durch diese Konstrukte bedingte Phosphataseaktivität lag nicht signifikant über den Werten von YS33 (siehe Tabelle 2.2).

Die Konstrukte pP4-12-GAF2 und pP4-12-GAF3 bewirkten eine Phosphataseaktivität, die unter nicht-induzierenden Bedingungen nicht wesentlich über der von YS33 lag. Bei Induktion zeigten sich jedoch Aktivitätswerte, die jene von YS33 deutlich übertrafen. Es war also in beiden Fällen ein chimäres Protein entstanden, welches in der Lage war, die Transkription am *PHO5*-Promotor zu aktivieren.

Die Konstrukte pP4-72-GAF2 und pP4-72-GAF3 zeigten noch deutlicher die Aktivierung der Transkription durch die chimären Proteine. So kam es schon unter nicht-induzierenden Bedingungen zu Aktivitätswerten die deutlich über der Hintergrundaktivität lagen. Diese erreichten jedoch nicht die Aktivität von YS31 unter den selben Bedingungen. Unter Induktion durch Phosphatmangel zeigte pP4-72-GAF2 einen starken Anstieg der Phosphataseaktivität. Diese lag nun sogar auf Höhe der Aktivität von YS31. Ein starker Anstieg, wie bei pP4-72-GAF2, konnte bei pP4-72-GAF3 nicht beobachtet werden.

	Klon / Stamm	Phosphataseaktivität	Phosphataseaktivität
		bei normaler Phosphatversorgung	bei Phosphatmangel
	YS31	96,9	343
	YS33	14,6 / 13,7	10,7 / 8,43
niedrige Kopienzahl des Plasmids	pP4-12-GAF1 in YS33	25,5	13,4
		23,3	9,1
		25,0	12,7
	pP4-12-GAF2 in YS33	26,8	27,7
		27,7	45,4
		25,0	51,7
		27,2	51,6
	pP4-12-GAF3 in YS33	25,5	65,1
		30,2	57,6
		29,9	80,9
hohe Kopienzahl des Plasmids	pP4-72-GAF1 in YS33	13,7	11,5
		13,3	11,6
		13,2	16,0
	pP4-72-GAF2 in YS33	45,8	285
		69,0	226
		62,9	281
		64,8	327
		57,1	378
	pP4-72-GAF3 in YS33	59,5	96,1
		49,8	99,0

Tabelle 2.2:

Die Tabelle zeigt die Meßwerte für die Phosphataseaktivität (in U/OD600) der mit den GAF-Konstrukten transformierten Hefen. Dabei enthalten pP4-12-GAF1 und pP4-72-GAF1 die kodierende Sequenz für den kompletten GAF, pP4-12-GAF2 und pP4-72-GAF2 die kodierende Sequenz für die 5'-Hälfte des GAF und pP4-12-GAF3 und pP4-72-GAF3 die kodierende Sequenz für die 3'-Hälfte des GAF, jeweils verbunden mit der DNA-bindende Domäne von Pho4 (siehe Abbildung 2.8). Zum Vergleich wurde auch die Phosphataseaktivität der Stämme YS31 und YS33 bestimmt. Die Aktivität wurde sowohl bei normalen Phosphatkonzentrationen wie auch nach Induktion durch Phosphatmangel bestimmt. Bei den Transformanten wurden Messungen von mehreren Klonen durchgeführt.

2.2.8 Untersuchung des Effekts der chimären Proteine auf die Chromatinstruktur am *PHO5*-Promotor durch die Spaltung des Chromatins mit ClaI

Neben der transkriptionsaktivierenden Eigenschaft der chimären Proteine ist die durch diese Proteine am *PHO5*-Promotor verursachte Veränderung der Chromatinstruktur von besonderem Interesse. Durch die Korrelation des Ausmaßes an transkriptioneller Aktivität mit der Öffnung der Chromatinstruktur sollten weitere Hinweise auf die funktionelle Beziehung dieser Phänomene gewonnen werden. Am *PHO5*-Promotor kann die Zugänglichkeit der DNA in der nativen Chromatinstruktur sehr einfach durch die Spaltbarkeit mit dem Restriktionsenzym ClaI bestimmt werden. Dies wird durch eine Erkennungssequenz für ClaI ermöglicht, welche innerhalb des Nukleosoms -2 liegt (Almer *et al.*, 1986).

Um diese Untersuchung durchführen zu können, müssen die Zellkerne der Hefen gewonnen werden. Dazu werden als erstes Flüssigkulturen der entsprechenden transformierten Hefen in großem Maßstab angesetzt. Hierfür wurden die mit den Konstrukten pP4-72-GAF2 und pP4-72-GAF3 transformierten Hefen ausgewählt. Auf eine Untersuchung der Konstrukte mit dem gesamten GAF wurde verzichtet. Dies geschah, weil die Konstrukte im Phosphatase-Test keine Transkriptionsaktivierung gezeigt hatten.

Die ausgewählten Transformanten wurden bis zum Erreichen einer geeigneten Zelldichte kultiviert. Durch Umsetzen in phosphatfreies Medium wurden die Kulturen induzierenden Bedingungen ausgesetzt. Die Hefezellen wurden dann durch Zentrifugation gewonnen. Anschließend wurde die Zellwand enzymatisch verdaut. Danach wurden die Zellen lysiert. Nach einer Aufreinigung wurde das Kernmaterial in geeigneten Portionen bei -80°C bis zur Durchführung der eigentlichen Untersuchungen tiefgefroren. Proben dieser Chromatinpräparationen wurden dann in Reaktionsansätzen mit ClaI inkubiert (siehe Abbildung 2.22). Im Anschluss wurde durch entsprechende Reinigungsschritte die DNA isoliert und mit dem Restriktionsenzym BspRI (einem Isoschizomer von HaeIII) gespalten. Während die Wahrscheinlichkeit für eine Spaltung an der ClaI-Stelle von der Zugänglichkeit der DNA in der Chromatinstruktur abhängt, ist die Spaltung der reinen DNA mit BspRI unter den gewählten Bedingungen immer vollständig. Durch die Spaltung mit BspRI entsteht am *PHO5*-Promotor ein Fragment definierter Länge. Dieses wird im Fall einer vorangegangenen Spaltung durch ClaI in zwei kleinere Fragmente zerlegt. Natürlich findet sich in den Reaktionsansätzen die gesamte genomische DNA und die

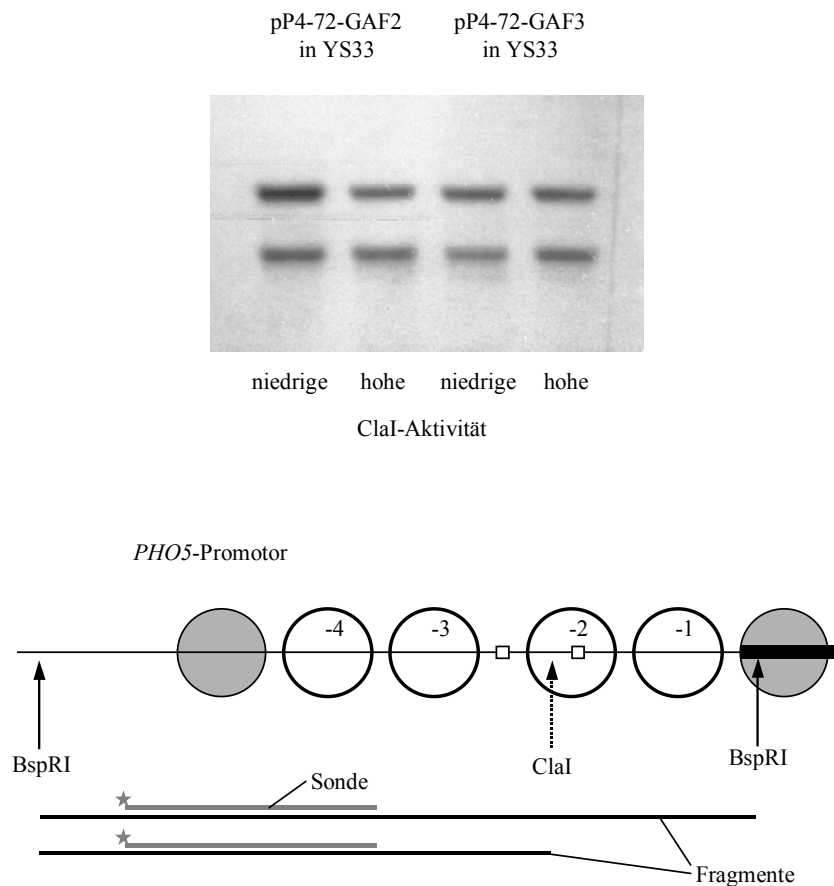


Abbildung 2.22:

Southern-Blot einer Untersuchung der Chromatinstruktur am *PHO5*-Promotor durch Spaltung des Chromatins mit dem Restriktionsenzym ClaI. Diese Abbildung zeigt den Effekt der durch die Plasmide pP4-72-GAF2 und pP4-72-GAF3 kodierten chimären Proteine am *PHO5*-Promotor unter induzierenden Bedingungen. In der Schemazeichnung sind die Verhältnisse am *PHO5*-Promotor dargestellt (vergleiche Abbildung 1.1). Die Entstehung und der Nachweis der DNA-Fragmente wird demonstriert.

Die Untersuchung wurde für beide Konstrukte jeweils durch Spaltung des Chromatins mit einer niedrigen und einer hohen Aktivität von ClaI durchgeführt. Nach Isolierung der DNA erfolgt eine Nachspaltung mit BspRI. Das Verhältnis der zwei Banden spiegelt dabei für jeden Ansatz das Verhältnis von ungespaltener zu gespaltener DNA wieder. Während die größere Bande aus ungespaltener DNA resultiert, entsteht die kleinere Bande bei erfolgter Spaltung der DNA.

Plasmid-DNA der Hefen. Um die gesuchten Fragmente nachzuweisen, mußte deshalb ein Southern-Blot durchgeführt werden.

Durch eine spezifische DNA-Sonde kann eines der beiden ClaI–BspRI–Fragmente und auch das große BspRI-Fragment selektiv autoradiographisch dargestellt werden (siehe Abbildung 2.22). Das Verhältnis der Bandenstärke des großen und des kleinen Fragments gibt dann direkt Aufschluß über die Zugänglichkeit der ClaI-Stelle im Chromatin. Als Ergebnis bewirken sowohl pP4-72-GAF2 wie auch pP4-72-GAF3 eine etwa 50%ige Öffnung der Chromatinstruktur (siehe Abbildung 2.22). Dabei fand sich zwischen den zwei Konstrukten kein Unterschied.

Bei der Präparation der Zellkerne wurde keine parallele Messung der Phosphataseaktivität durchgeführt. Deshalb musste nachträglich belegt werden, dass die bei den Phosphataseaktivitätsmessungen bestimmte transkriptionelle Aktivität auch bei den Zellen der Kernpräparation vorlag. Insbesondere musste ausgeschlossen werden, dass eine unterschiedliche Zelldichte bei der Kernpräparation im Vergleich zu den Messungen der Phosphataseaktivität zu einer wesentlichen Änderung der Transkriptionsaktivität geführt hatte. Darum wurden Phosphataseaktivitätswerte bei verschiedenen Wachstumsdichten der mit dem Konstrukt pP4-72-GAF2 transformierten Hefen bestimmt. So konnte gezeigt werden, dass die Phosphataseaktivität der Hefen in einem weiten Bereich konstant und von der Zelldichte unabhängig ist (siehe Tabelle 2.3). Daher können die Ergebnisse der Chromatinuntersuchungen zu den gemessenen Phosphataseaktivitäten in Bezug gesetzt werden.

Zelldichte	1,0	2,0	3,85	4,55	4,85	4,9
Phosphataseaktivität	61,0	41,7	50,0	44,1	50,4	36,7

Tabelle 2.3:

Die Tabelle zeigt Meßwerte für die Phosphataseaktivität bei verschiedenen Wachstumsdichten. Dazu wurden Kulturen eines Klons von YS33, transformiert mit pP4-72-GAF2, bis zum Erreichen der angegebenen Zelldichte (gemessen in OD₆₀₀/ml) inkubiert. Die anschließende Messung der Phosphataseaktivität (Angabe in U/OD₆₀₀) zeigt bis zu einer Kulturdichte von 4,85 OD₆₀₀/ml Unabhängigkeit der Phosphataseaktivität von der Wachstumsdichte der Hefe.

2.2.9 Untersuchung der Veränderung der Chromatinstruktur durch die chimären Proteine mittels DNaseI-Spaltung

Die Chromatinpräparationen welche für die Untersuchung der ClaI-Spaltbarkeit hergestellt worden waren, sollten mit einer weiteren Methode untersucht werden. Bei diesem Experiment wird nicht nur die Zugänglichkeit des Chromatins an einer bestimmten Stelle, sondern im ganzen Promotor untersucht. Dazu wird die Chromatinpräparation einer unspezifischen Endonuklease, DNaseI, ausgesetzt (siehe Abbildung 2.23; Almer *et al.*, 1986). Nach Ablauf der Reaktionszeit wird die DNA isoliert. Die reine DNA wird dann mit ApaI gespalten. Dadurch entstehen Fragmente die von der ApaI Schnittstelle aus in den *PHO5*-Promotor hineinreichen. Die Länge jedes einzelnen Fragments wird an einem Ende durch die definierte ApaI-Schnittstelle begrenzt und am anderen Ende durch den an jedem Punkt der gesamte Sequenz möglichen Schnitt der DNaseI. Die Häufigkeit eines Schnittes der DNaseI an einem bestimmten Punkt, und damit auch die Häufigkeit einer bestimmten Länge der eben beschriebenen Fragmente, ist nicht zufällig. Statt dessen hängt sie von der Zugänglichkeit dieses Punktes für die DNaseI in der intakten Chromatinstruktur ab. Die entsprechenden Fragmente müssen auch hier gegen die Vielzahl aller Fragmente der Hefezell-DNA spezifisch zur Darstellung gebracht werden. Deshalb werden die Proben nach einer Aufreinigung über einen Southern-Blot aufgetrennt und die gesuchten Fragmente mit einer spezifischen Sonde detektiert. Autoradiographisch läßt sich dann ein typisches Bandenmuster darstellen (siehe Abbildung 2.23).

Im reprimierten Zustand stellt sich der *PHO5*-Promotor in der Autoradiographie mit einer breiten Bande, die dem hypersensitiven Bereich zwischen Nukleosom –2 und –3 entspricht, dar. Diese breite Bande wird beidseitig von mehreren schmalen Banden flankiert. Diese Banden entsprechen den Bereichen zwischen den positionierten Nukleosomen im Promotor. Bei voller Induktion verändert sich dieses Bild in charakteristischer Weise (Svaren & Hörz, 1997). Sowohl die breite Bande als auch die schmalen Banden sind nicht mehr abgrenzbar. Stattdessen findet sich eine nahezu gleichmäßige Schwärzung des gesamten Bereichs. Aufgrund der Strukturveränderung des Chromatins wird die DNA, im gesamten Promotor nicht mehr vor dem Zugriff der DNaseI geschützt.

Diese Untersuchung der Chromatinstruktur wurde für die Kernpräparationen der mit pP4-72-GAF2 und der mit pP4-72-GAF3 transformierten und durch Phosphatmangel induzierten Hefen durchgeführt.

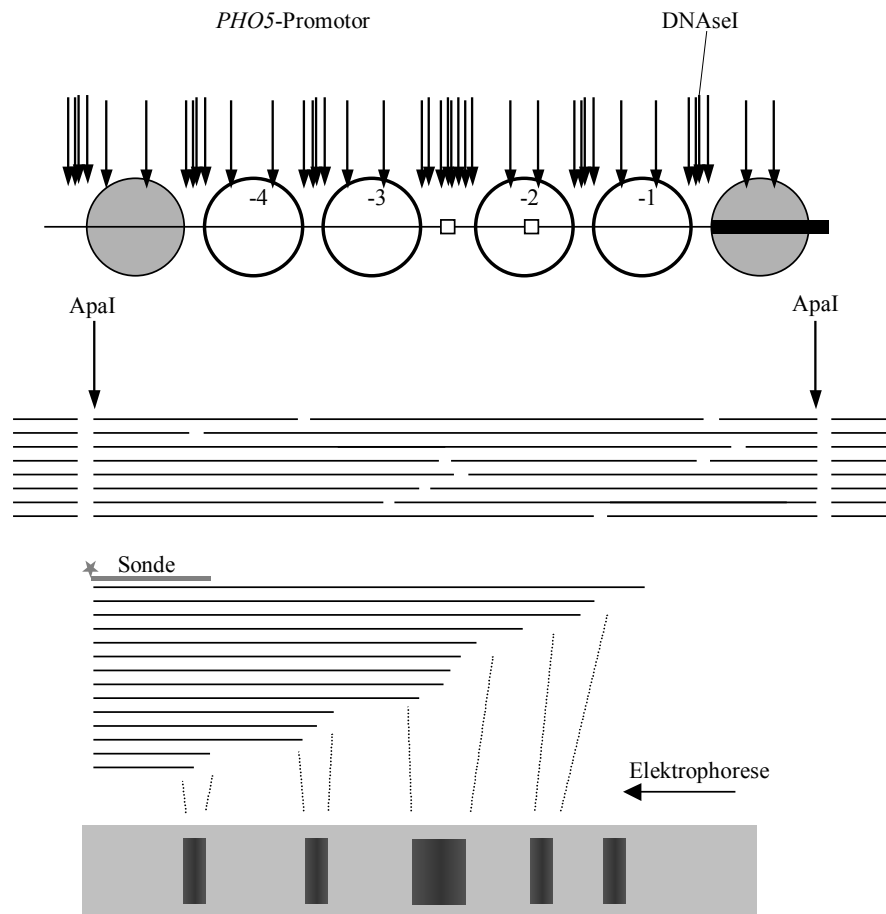


Abbildung 2.23:

Dieses Schema erläutert die Untersuchung der Chromatinstruktur am *PHO5*-Promotor durch Spaltung mit DNaseI. Im oberen Teilbild ist der *PHO5*-Promotor mit Chromatinstruktur dargestellt (vergleiche Abbildung 1.1). Es wird die Spaltung des Chromatins mit DNaseI demonstriert. Die Pfeile zeigen die Häufung von Spaltungen der DNA in nicht-nukleosomalen Abschnitten. Im mittleren Teilbild ist die Vielfalt der resultierenden Fragmente dargestellt. Es erfolgt eine Nachspaltung der isolierten DNA mit ApaI. Im unteren Teilbild wird gezeigt, dass die radioaktive Sonde nur Fragmente aus dem *PHO5*-Promotor zur Darstellung bringt. Zudem werden nur die Fragmente erkannt, die bis an die linke ApaI-Schnittstelle heranreichen. Die Längenverteilung der Fragmente hängt damit von der Häufigkeit ab, mit der die DNaseI die DNA-Abschnitte im Chromatin des Promotors spaltet. Der Southern-blot bringt die Längenverteilung der Fragmente und damit indirekt die Chromatinstruktur des Promotors zur Darstellung.

Im Experiment wurden zum Vergleich Kernpräparationen von durch Phosphatmangel induzierten und mit pP4-72 sowie mit pP4-70 transformierten Zellen von YS33 mitgeführt (siehe Abbildung 2.24).

Die mit pP4-72 transformierten Hefen zeigen, da ihnen ein funktionell aktives Pho4 fehlt, trotz Induktion durch Phosphatmangel ein Bandenmuster, welches für den reprimierten Zustand typisch ist. Bei den mit pP4-70 transformierten Hefen wird dagegen Pho4 durch das Plasmid exprimiert. Pho4 steht dabei nicht unter negativer Kontrolle durch Pho80 und die *PHO5*-Expression ist induziert. Deshalb zeigt hier der *PHO5*-Promotor eine vollständige Öffnung des Chromatins (siehe Abbildung 2.24).

Die Kernpräparationen für die Konstrukte pP4-72-GAF2 und pP4-72-GAF3 zeigen ein Bandenmuster, welches die deutliche Abgrenzbarkeit, wie sie bei pP4-72 vorliegt, verloren hat. Es ist aber noch nicht die gleichmäßige Schwärzung wie bei pP4-70 aufgetreten (siehe Abbildung 2.24; die entsprechenden Bandenmuster werden in der Legende beschrieben). Es findet sich also ein Zustand der Chromatinstruktur, der zwischen dem typischen Bild bei vollständiger Repression und dem bei vollständiger Induktion liegt. Dabei unterscheiden sich beide Konstrukte nicht wesentlich voneinander.

Zusammenfassend ergibt sich für die chimären Proteine, dass die Konstrukte mit dem gesamten GAF in den durchgeführten Experimenten keine funktionelle Aktivität aufwiesen. Die Konstrukte mit jeweils nur einer Hälfte des GAF zeigten dagegen sowohl die Transkription aktivierende als auch die Chromatinstruktur öffnende Aktivität am *PHO5*-Promotor.

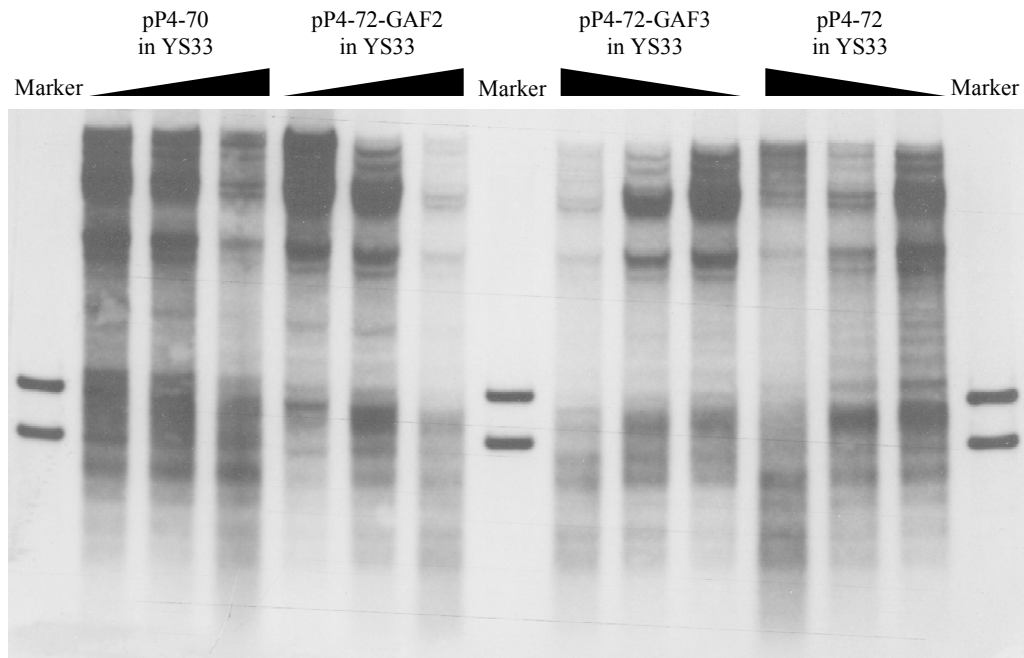


Abbildung 2.24:

Southern-Blot einer Untersuchung der Chromatinstruktur am *PHO5*-Promotor durch Spaltung des Chromatins mit DNaseI. Diese Abbildung zeigt die Veränderung der Chromatinstruktur durch die von den Plasmiden pP4-72-GAF2 und pP4-72-GAF3 kodierten chimären Proteine am *PHO5*-Promotor unter induzierenden Bedingungen. Die Untersuchung wurde für beide Konstrukte jeweils mit verschiedenen hohen Aktivitäten von DNaseI durchgeführt (Diese sind in der Abbildung durch die Höhe des schwarzen Keils veranschaulicht). Die Durchführung mehrerer Ansätze ist notwendig, da die Spaltung mit DNaseI jeweils nur einen kleinen Bereich der interessierenden DNA gut zur Darstellung bringt. Bei der Interpretation des Versuchs sind deshalb alle abgebildeten Ansätze zu berücksichtigen. Um die Bewertung der Versuchsergebnisse zu ermöglichen, wurden Kernpräparationen von Transformanten der Plasmide pP4-70 sowie pP4-72 mitgeführt. pP4-70 zeigt einen maximal induzierten und pP4-72 einen vollständig reprimierten Promotor. Es wurden zudem DNA-Fragmente als Positionsmarker mitgeführt. Dabei entspricht die größere Bande der Position der Clal-Schnittstelle (Nukleosom -2) und die kleinere Bande der Position einer BamHI-Schnittstelle (zwischen Nukleosom -3 und -4). In den Präparationen von pP4-72 zeigt sich ein regelmäßiges Muster bandenförmiger Aufhellungen auf dunklem Grund. Diese Aufhellungen stehen für DNA-Bereiche die vor dem Zugriff von DNaseI geschützt sind. Sie entsprechen der Position von Nukleosomen. Das regelmäßige Muster von Aufhellungen wird durch einen breiten Bereich gleichmäßiger Schwärzung unterbrochen. Durch Vergleich mit der Größenreferenz ist zu erkennen, daß es sich hierbei um den hypersensitiven DNA-Abschnitt zwischen Nukleosom -2 und -3 handelt. Bei der Präparation von pP4-70 lassen sich die zu den Nukleosomen -1 bis -4 gehörigen Aufhellungen nicht mehr abgrenzen.

Vom hypersensitiven DNA-Abschnitt aus erstreckt sich eine nahezu gleichmäßige Schwärzung über den gesamten Bindungsbereich der Nukleosomen -1 bis -4. Die beiden Konstrukte pP4-72-GAF2 und pP4-72-GAF3 zeigen ein Bild, daß sich im Bezug auf die Präparationen von pP4-70 und pP4-72 am besten als intermediär beschreiben läßt. Es sind zwar immer noch den positionierten Nukleosomen des Promotors entsprechende Aufhellungen nachweisbar, die klare Abgrenzbarkeit, wie bei pP4-72, besteht aber nicht mehr. Ein Unterschied zwischen pP4-72-GAF2 und pP4-72-GAF3 zeigt sich dabei nicht.

3. Diskussion

3.1 Definition der transaktivierenden Domäne durch Deletionsmutanten von PHO4

Die hier dargestellten Resultate für die *in vivo* Aktivität der *PHO4*-Deletionsmutanten ermöglichen Rückschlüsse auf Zusammenhänge von Struktur und Funktion von Pho4. Anhand der Ergebnisse kann gezeigt werden, dass der Abschnitt des Pho4-Proteins zwischen den Aminosäuren 96 und 111 an der transkriptionsaktivierenden Funktion des Proteins nicht wesentlich beteiligt ist. Besondere Bedeutung gewinnen diese Daten aus der zusammenfassenden Bewertung mit veröffentlichten, weiterführenden Ergebnissen. Bereits im Vorfeld wurde gezeigt, dass sich für die Aktivierung der Transkription wesentliche Abschnitte von Pho4 im Bereich der ersten 108 Aminosäuren befinden (Ogawa & Oshima, 1990). Später erwiesen sich die ersten 75 Aminosäuren als entbehrlich für die Aktivierung der Transkription (Jayaraman *et al.*, 1994). Die Lokalisation einer potentiellen transaktivierenden Domäne von Pho4 konnte somit auf die Aminosäuren 75 bis 108 begrenzt werden.

McAndrew *et al.* (1998) demonstrierten schließlich durch die *in vivo* Untersuchung einer Vielzahl von Deletionsmutanten, dass die Transaktivierung durch Pho4 von einem Abschnitt des Proteins bewirkt wird, der aus den Aminosäuren 79 bis 99 besteht (siehe Abb. 3.1). Dabei ermöglichten die hier hergestellten Deletionen ($\Delta 97-106$ und $\Delta 101-110$) die C-terminale Eingrenzung dieser transaktivierenden Domäne. Wie von McAndrew *et al.* nochmals gezeigt wurde, weisen beide Konstrukte keine wesentlichen Einbußen in ihrer transkriptionsaktivierenden Wirkung auf. Die entscheidenden Abschnitte der transaktivierenden Domäne von Pho4 liegen also N-terminal der Aminosäure 97.

Die von McAndrew *et al.* vorgestellten Daten für die Konstrukte $\Delta 12-79$ und $\Delta 12-83$ zeigen die N-terminale Begrenzung der transaktivierenden Domäne. Im Gegensatz zu $\Delta 12-79$ führt $\Delta 12-83$ zu einer deutlich reduzierten Transkription von *PHO5*. Damit ist der Bereich für die transaktivierende Domäne von Pho4 auf den Abschnitt zwischen den Aminosäuren 79 und 97 eingegrenzt. Die ebenfalls untersuchte Deletion der Aminosäuren 79 bis 99 führte folgerichtig zum Ausfall der Transkriptionsaktivierung.

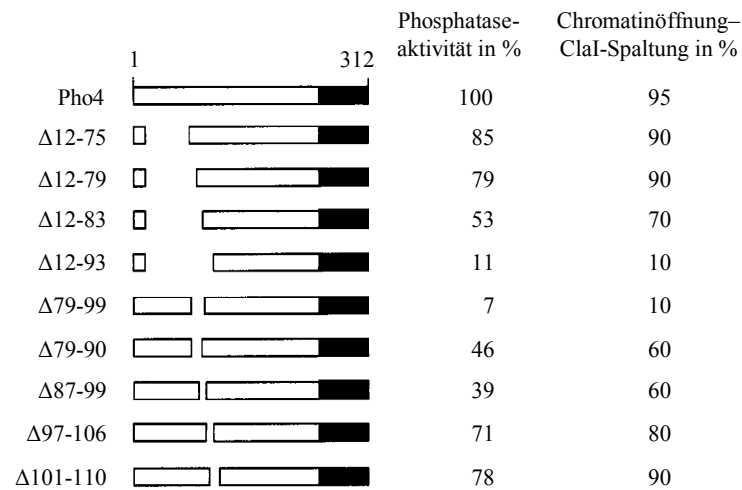


Abbildung 3.1:

Modifiziert nach McAndrew *et al.* (1998) zeigt diese Darstellung Untersuchungsergebnisse zu Deletionsmutanten von *PHO4*. Es wurde die Aktivität der verschiedenen Proteine bei der Aktivierung der Transkription von *PHO5* bestimmt. Die Messungen wurden nach Transformation in einen Hefestamm defizient für *PHO80* und *PHO4* und ohne Induktion durch Phosphatmangel durchgeführt. Parallel dazu wurde die von den Konstrukten bewirkte Chromatinöffnung durch Untersuchung der Zugänglichkeit der ClaI-Schnittstelle im Nukleosom –2 bestimmt.

Die Aminosäuren 79 bis 97 bilden damit die transkriptionsaktivierende Domäne von Pho4. Die Konstrukte Δ79-90 und Δ87-99 zeigten eine reduzierte, aber dennoch vorhandener Aktivität. Damit aktivieren diese beiden Teile der Domäne unabhängig voneinander die Transkription.

Neben der Aktivierung der Transkription, wurde von McAndrew *et al.* für alle Konstrukte auch die durch sie bedingte Öffnung der Chromatinstruktur untersucht. Die dazu durchgeführten ClaI-Spaltungen von Chromatinpräparationen zeigten eine eindeutige Korrelation der Transkriptionsaktivierung mit der Chromatinöffnung (siehe Abbildung 3.1).

Durch die bisher vorgestellten Ergebnisse konnte nicht geklärt werden, ob die so charakterisierte transaktivierende Domäne ihre Funktion selbstständig bewirkt, oder ob sie auf das unmittelbare Zusammenwirken mit anderen Abschnitten des Pho4-Proteins angewiesen ist. Um dieses Problem zu lösen, stellten McAndrew *et al.* auch

umfangreiche C-terminale Deletionen von Pho4 her. Da diese Deletionen auch die DNA-Bindungsdomäne betrafen, wurden Fusionskonstrukte aus den *PHO4*-Fragmenten mit LexA hergestellt. LexA ist ein bakterieller Repressor. Die Bindung des LexA-Anteils der Fusionskonstrukte an Lex-Operatoren in einem LacZ-Reportersystem ermöglichte die Messung der transkriptionsaktivierenden Wirkung der Fusionskonstrukte. So konnte gezeigt werden, dass C-terminale Deletionen bis zur Aminosäure 93 von Pho4 keine Reduktion der Transkriptionsaktivierung im Vergleich zur Fusion von LexA mit dem gesamten Pho4 aufwiesen. Das Fusionsprotein, aus LexA und den ersten 83 Aminosäuren von Pho4, konnte die Transkription aber nicht mehr signifikant aktivieren. Damit konnte die vorgenommene Eingrenzung der transkriptionsaktivierenden Domäne bestätigt werden.

Schließlich konnten McAndrew *et al.* eine minimale, transkriptionsaktivierende Domäne von Pho4 definieren. Dies gelang aufgrund der uneingeschränkten Aktivität eines Fusionskonstruktes aus LexA und den Aminosäuren 75 bis 99 von Pho4. Dieser Abschnitt von Pho4 ist als minimale transaktivierende Domäne selbstständig in der Lage die Transkription zu aktivieren.

Um zusätzliche Informationen über funktionell bedeutsame Strukturen der transkriptionsaktivierenden Domäne zu erhalten, wurde von McAndrew *et al.* ein weiterer Ansatz verfolgt. Es zeigte sich, dass Fusionskonstrukte von Pho4 mit Cpf1, bei welchen die DNA-bindende Domäne von Pho4 durch jene von Cpf1 ersetzt wurde, an UASp1 und UASp2 von *PHO5* binden und die Transkription aktivieren. Die Aktivität dieser Konstrukte wird dabei aber von Veränderungen in der transkriptionsaktivierenden Domäne sehr viel stärker beeinträchtigt, als dies bei entsprechenden Pho4-Konstrukten der Fall ist. Mit Hilfe dieser Konstrukte konnte die funktionelle Bedeutung einzelner Aminosäuren in der transkriptionsaktivierenden Domäne untersucht werden.

Bei anderen Transaktivatoren, wie Gcn4 (Drysdale *et al.*, 1995) oder VP16 (Regier *et al.*, 1993), wurden Aminosäuren mit großem hydrophoben Rest, vor allem aromatische Aminosäuren, als besonders wichtig für die transkriptionsaktivierende Aktivität dieser Moleküle beschrieben. Deshalb wurden von McAndrew *et al.* entsprechende Aminosäuren in der transkriptionsaktivierenden Domäne von Pho4 mit Hilfe der Pho4-Cpf1 Fusionsproteine untersucht. Für den Phenylalaninrest an Position 81 des Wildtyp-Pho4 wurden Konstrukte mit einem Aminosäureaustausch zu Alanin, Tryptophan oder Tyrosin hergestellt. Während Alanin an dieser Position zu

einer signifikanten Reduktion der Aktivität führte, blieb die transkriptionsaktivierende Funktion bei den Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin größtenteils erhalten. Damit ist ein großer, hydrophober und aromatischer Aminosäurerest an der Position 81 wichtig für die Aktivität der transaktivierenden Domäne von Pho4. Für die Aminosäuren 88 bis 93 wurden ebenfalls jeweils Konstrukte mit einem Alaninrest an der entsprechenden Position hergestellt und untersucht. Es zeigte sich jedoch nur beim Austausch des Tryptophans an Position 91 gegen Alanin eine ausgeprägte Reduktion der Transkriptionsaktivierung. Für ausgewählte Konstrukte mit dem Austausch einer einzelnen Aminosäure wurde ebenfalls die Öffnung der Chromatinstruktur untersucht. In jedem Fall korrelierte dabei die Aktivierung der Transkription mit der Öffnung der Chromatinstruktur. Eine Auftrennung dieser beiden Funktionen war bei keinem Konstrukt zu beobachten.

Für den Abschnitt von Pho4 zwischen den Aminosäuren 74 bis 85 wurde eine amphipathische, α -helicale Sekundärstruktur vorgeschlagen (Jayaraman *et al.*, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass α -Helices eine wesentliche Bedeutung für die Funktion von Transaktivatoren besitzen (zum Beispiel für VP16, Uesugi *et al.*, 1997). Deshalb wurde von McAndrew *et al.* der Einfluss dieser möglichen Sekundärstruktur auf die Transkriptionsaktivierung untersucht. Dazu wurden zwei Konstrukte hergestellt, die einen Austausch des Glutamatrestes an Position 78 gegen Alanin oder Prolin enthielten. Der Austausch zu Alanin zeigte keinen negativen Effekt auf die transaktivierende Wirkung des Konstruktes und belegte damit, dass der Glutamatrest an dieser Position an der Transkriptionsaktivierung nicht spezifisch beteiligt ist. Der Austausch gegen Prolin zeigte aber eine ausgeprägte Reduktion der Aktivität. Da die Einführung eines Prolinrestes zu der Zerstörung einer α -helicalen Sekundärstruktur führt, legen diese Ergebnisse das Vorliegen der angenommenen α -Helix nahe und zeigen gleichzeitig ihre Bedeutung für die Aktivierung der Transkription auf.

Zur näheren Untersuchung der Sekundärstruktur der transaktivierenden Domäne von Pho4 wurden von McAndrew *et al.* Circular-Dichroismus-Spektroskopien durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurden Peptide verwendet, welche die transaktivierende Domäne von Pho4 beinhalten. Neben einem Peptid mit der Wildtypsequenz wurden auch zwei Peptide mit einem Austausch des Glutamatrestes an Position 78 gegen Alanin und Prolin untersucht. Für das Peptid mit der Wildtypsequenz und das Peptid mit dem Austausch zu Alanin ergaben sich Belege für eine α -

helicale Sekundärstruktur. Dagegen gab es keine entsprechenden Ergebnisse für das Peptid mit dem Austausch zu Prolin. Diese Daten bestätigen somit die Resultate der Experimente mit den an der Position 78 veränderten Pho4-Cpfl Fusionsproteinen. Die Annahmen hinsichtlich der α -helicalen Sekundärstruktur im Bereich der Aminosäuren 74 bis 85 werden durch diese Ergebnisse ebenfalls gestützt.

Die Daten von McAndrew *et al.* lassen sich wie folgt zusammenfassen. Die Funktionen des Pho4-Proteins, Transkriptionsaktivierung und Öffnung der Chromatinstruktur, werden durch eine einzelne Domäne des Proteins bewirkt. Diese Domäne besteht im Kern aus den Aminosäuren 79 bis 99. Teile dieser Domäne sind ebenfalls in der Lage die Transkription zu aktivieren, wie anhand der Deletionen $\Delta 79-90$ und $\Delta 87-99$ gezeigt werden konnte. Deutliche Hinweise auf die Sekundärstruktur legen für den Bereich der Aminosäuren 74 bis 85 eine α -helicale Struktur nahe. Diese α -Helix könnte einen wesentlichen Anteil an der Aktivität der transkriptionsaktivierenden Domäne haben. Neben der Bedeutung der wahrscheinlich vorliegenden α -Helix ist auch der wesentliche Anteil der Aminosäuren Phenylalanin an Position 81 und Tryptophan an Position 91 an der Aktivität der Domäne aufzuführen.

Die umfassenden Ergebnisse von McAndrew *et al.* ermöglichen die präzise Eingrenzung jener Strukturen von Pho4, welche für Chromatinöffnung und Transkriptionsaktivierung verantwortlich sind. Wie diese Vorgänge bewirkt werden, ist jedoch aus diesen Daten nicht zu ersehen. Obwohl sich zur Zeit aus dem Stand der wissenschaftlichen Literatur noch kein umfassendes Modell für die Mechanismen der Chromatinöffnung und Transkriptionsaktivierung am *PHO5*-Promotor ableiten lässt, können aufgrund der zunehmenden Fülle experimenteller Ergebnisse mögliche Modelle umrissen werden. Belegt ist, dass eine geschlossene Chromatinstruktur am *PHO5*-Promotor die Transkriptionsaktivierung von *PHO5* verhindert (Straka & Hörz, 1991). Die Öffnung der Chromatinstruktur ist also Voraussetzung für eine effiziente Transkriptionsaktivierung. Die Bindung von Pho4 an den Promotor ist essentiell für die Öffnung der Chromatinstruktur (Svaren *et al.*, 1994). Weitere Faktoren, die für diesen Vorgang von wesentlicher Bedeutung sind, wurden bereits charakterisiert. Die Histonacetylase Gcn5, Bestandteil zumindest zweier verschiedener Histonacetylasekomplexe: ADA und SAGA (Grant *et al.*, 1997), wurde als einer dieser Kofaktoren identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *GCN5* zu Veränderungen am Verhalten der Chromatinstruktur und der

Transkriptionsaktivität des *PHO5*-Promotors führt (Gregory *et al.*, 1998, 1). Diese Änderungen äußern sich insbesondere in Stämmen mit einem $\Delta gcn5 + \Delta pho80$ Genotyp. Bei Fehlen von Pho80 kommt es konstitutiv zur Öffnung der Chromatinstruktur und Aktivierung der Transkription von *PHO5*. Bei gleichzeitigem Fehlen von *GCN5* ist die Ordnung der Chromatinstruktur am Promotor gestört und es kommt zu einer deutlichen Reduktion der *PHO5* Expression. Eine maximale Induktion des *PHO5*-Promotors durch Phosphatmangel hebt den Phänotyp, welcher durch das Fehlen von *GCN5* verursacht wird fast vollständig auf (Gregory *et al.*, 1998, 1). Daraus kann man schließen, dass *GCN5* an der Öffnung der Chromatinstruktur und Transkriptionsaktivierung am *PHO5*-Promotor zwar beteiligt ist, aber keine essentielle Bedeutung für diese Vorgänge hat.

Untersuchungen zur Kinetik der Öffnung des Chromatins am Promotor und der Transkriptionsaktivierung von *PHO5* zeigen ebenfalls eine Mitwirkung von *GCN5* an diesen Prozessen auf (Barbaric *et al.*, 2001). Bei *GCN5*-defizienten Stämmen konnte eine deutliche Verzögerung beider Vorgänge nach Induktion durch Phosphatmangel beobachtet werden. Barbaric *et al.* (2001) verwendeten auch *GCN5*-Mutanten, welche für ein strukturell intaktes Gcn5 kodieren. Diese Mutanten besaßen jeweils eine verminderte, sowie eine vollständig fehlende Gcn5-Histonacetylaseaktivität. Dies ermöglichte den Nachweis, dass der Mangel an Gcn5-Acetylaseaktivität und nicht das Fehlen des Proteins selbst, für die beobachtete Verzögerung der Chromatinöffnung und Transkriptionsaktivierung verantwortlich ist. Barbaric *et al.* (2003) konnten schließlich durch Chromatin-Immunopräzipitation *in vivo* zeigen, dass der SAGA-Komplex und damit Gcn5 unter induzierenden Bedingungen und abhängig von Pho4 an den *PHO5*-Promotor rekrutiert wird. Eine wesentliche funktionelle Bedeutung der Histonacetylierung scheint ihre Wirkung auf die Bindung von histonmodifizierenden und chromatinremodellierenden Komplexen zu sein. Hassan *et al.* (2001) zeigten *in vitro*, dass die Bindung von SAGA und Swi/Snf an Chromatinabschnitte durch eine Acetylierung der Histone des Chromatins stabilisiert wird.

Neben der Bedeutung von *GCN5* wurde die Abhängigkeit der Chromatinöffnung und Transkriptionsaktivierung von *PHO5* von der Aktivität des chromatinremodellierenden Swi/Snf-Komplexes gezeigt. Durch die Disruption von *SNF2* wird dieser Komplex inaktiviert (Peterson & Tamkun, 1995). Obwohl sich diese Mutation nur gering auf die Aktivierbarkeit der Transkription von *PHO5* auswirkt (Gaudreau *et*

al., 1997), konnte gezeigt werden (S. Barbaric & W. Hörz, unpublizierte Daten; auch gezeigt in Reinke & Hörz, 2003), dass das Fehlen von *SNF2*, ähnlich wie bei *GCN5*, zu einer deutlichen Verzögerung der Chromatinöffnung und Transkriptionsaktivierung führt. Damit hat der Swi/Snf-Komplex eine wesentliche Bedeutung für beide Vorgänge. Die Beobachtung, dass ein weiterer chromatinremodellierender Proteinkomplex, Ino80, Pho4-abhängig an den *PHO5*-Promotor rekrutiert wird (Steger *et al.*, 2003), gibt eine mögliche Erklärung dafür, weshalb Swi/Snf nicht essentiell für die Chromatinöffnung und Transkriptionsaktivierung von *PHO5* ist. Die fehlende Aktivität des Swi/Snf-Komplexes könnte zumindest partiell durch einen anderen chromatinremodellierenden Komplex, wie Ino80, ausgeglichen werden.

Daten über mögliche Mechanismen der Transkriptionsaktivierung am *PHO5*-Promotor wurden ebenfalls erhoben. Für Pho4 und Pho2 wurde *in vitro* die Bindung an die allgemeinen Transkriptionsfaktoren TBP, TFIIB, TFIIE-beta nachgewiesen (Magbanua *et al.*, 1997). Durch Verwendung eines Hefestammes mit einer zu einem einzelnen Aminosäureaustausch führenden Mutation des TFIIB, konnte *in vivo* die kritische Abhängigkeit der Transkriptionsaktivierung am *PHO5*-Promotor von TFIIB demonstriert werden (Wu & Hampsey, 1999). Die Autoren konnten auch eine gestörte Bindung von Pho4 an den veränderten TFIIB im Vergleich zum Wildtypprotein *in vitro* nachweisen. Außerdem zeigten sie eine Konformationsänderung von TFIIB aufgrund der Interaktion mit Pho4. Auch diese Konformationsänderung wurde am Genprodukt der TFIIB-Mutation nicht beobachtet. Die gleiche Mutation von TFIIB führt somit zu einer gestörten Interaktion mit Pho4 *in vitro* und gleichzeitig zu einer massiv beeinträchtigten Transkriptionsaktivierung von *PHO5 in vivo*. Dies lässt den Schluss zu, dass die beobachtete Interaktion zwischen TFIIB und Pho4 spezifisch ist und grundlegende Bedeutung für die Transkriptionsaktivierung von *PHO5* hat.

Die zeitliche Abfolge und Wechselwirkung der dargestellten Mechanismen bei der Öffnung der Chromatinstruktur und Aktivierung der Transkription am *PHO5*-Promotor konnte bisher noch nicht abschließend geklärt werden.

Der erste Schritt bei der Chromatinöffnung am *PHO5*-Promotor als Folge einer Induktion, ist wahrscheinlich die Bindung von Pho4 zusammen mit Pho2 an UASp1 im Promotor. Eine Bindung von Pho4 und Pho2 an UASp2 im Nukleosom -2 wird durch das Nukleosom zunächst unterbunden (Venter *et al.*, 1994). Als Nächstes wird

vermutlich über Pho4 der Histonacetylasekomplex SAGA sowie der chromatinremodellierende Komplex Swi/Snf an den *PHO5*-Promotor rekrutiert. Die Acetylierung der Histone am Promotor durch Gcn5 führt dann zu einer Stabilisierung der Bindung von SAGA und Swi/Snf am Promotor. Diesem Modell folgend, könnte der am *PHO5*-Promotor stabil gebundene Swi/Snf-Komplex durch seine chromatinremodellierende Aktivität das Nukleosom -2 destabilisieren. Dies würde dann eine Bindung von Pho4 an UASp2 ermöglichen. Die Bindung von Pho4 und Pho2 an UASp1 und UASp2 würde die vollständige Öffnung des Chromatins am *PHO5*-Promotor einleiten. Als Nächstes könnte, möglicherweise vermittelt durch die Interaktion von Pho4 mit TFIIB, der Holoenzymkomplex an den *PHO5*-Promotor rekrutiert werden. Schließlich würde die Transkription von *PHO5* initiiert werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bereits viele Erkenntnisse über die Mechanismen der Chromatinöffnung und Transkriptionsaktivierung am *PHO5*-Promotor gewonnen werden konnten. Über die Interaktionen der einzelnen, beteiligten Faktoren und die zeitliche Abfolge der Vorgänge ist jedoch noch wenig bekannt. Die zielgerichtete Mutation beteiligter Faktoren ist hier ein experimentelles Mittel von hohem Wert. Mit Hilfe solcher Mutationen, die zu veränderten Proteinen mit genau charakterisierten Aktivitäten führen, wird es möglich sein, im Experiment ein Modell für diese Abläufe zu erstellen und zu belegen. Dazu ist jedoch die präzise Charakterisierung der Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion der beteiligten Faktoren Voraussetzung. Die nun vorliegenden Erkenntnisse über die Aktivierungsdomäne von Pho4 entsprechen dieser Anforderung.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten und untersuchten Deletionsmutanten von *PHO4* wurde zur Charakterisierung der Aktivierungsdomäne von Pho4 ein wesentlicher Beitrag geleistet.

3.2 Chimäre GAF-Konstrukte am *PHO5*-Promotor

Aus den experimentellen Ergebnissen für die GAF-Konstrukte können mehrere Schlussfolgerungen gezogen werden. Zunächst ist jedoch festzustellen, dass die Inaktivität des Fusionskonstruktes mit dem gesamten GAF am ehesten auf einen mangelnden Transport in den Nukleus oder eine hohe Instabilität des Proteins zurückzuführen ist. Eine gestörte Proteinsynthese erscheint aufgrund der ausgeprägten Aktivität der zwei anderen Konstrukte eher nicht verantwortlich zu sein. In jedem

Fall ist jedoch aus dem GAF1-Konstrukt keine Erkenntnis hinsichtlich der Aktivität des GAF am *PHO5*-Promotor zu gewinnen.

Im Gegensatz dazu zeigen die Fusionskonstrukte mit den Hälften des GAF eine deutliche Öffnung der Chromatinstruktur sowie eine Aktivierung der Transkription am *PHO5*-Promotor. Die Transkriptionsaktivität steigert sich jeweils bei verstärkter Expression der Konstrukte sowie bei Induktion durch Phosphatmangel. Die Ergebnisse mit diesen Konstrukten sind in mehrfacher Hinsicht überraschend.

Beide Konstrukte führen zu einer in Umfang und Art gleichen Remodellierung der Chromatinstruktur am *PHO5*-Promotor. Dieses Ergebnis ist aus zwei Gründen bemerkenswert. Zum einen steht die gleichartige Chromatinöffnung im deutlichen Gegensatz zu der unterschiedlich starken Aktivierung der Transkription. Diese führte zu einer um den Faktor drei verschiedenen Phosphataseaktivität. Zum anderen bestehen beide Konstrukte aus verschiedenen Teilen des GAF, die unterschiedliche Domänen enthalten. Es war also nicht zu erwarten, dass diese derart verschiedenen Konstrukte sich hinsichtlich der Chromatinöffnung ähnlich verhalten würden.

Das Zusammentreffen von deutlich unterschiedlicher Transkriptionsaktivität bei gleichartiger Öffnung der Chromatinstruktur erlaubt Schlussfolgerungen in Bezug auf die Wirkungsmechanismen des GAF. Von einigen Autoren wird die Hypothese vertreten, dass der GAF durch Derepression eine Aktivierung der Transkription bewirkt (Kerrigan *et al.*, 1991; Croston *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1993; Sandaltzopoulos *et al.*, 1995; Okada & Hirose, 1998). Damit ist die Aufhebung einer durch die Chromatinstruktur bedingten Repression der Transkription durch Remodellierung des Chromatins gemeint. Wie durch Han und Grunstein (1988) anhand einer Blockade der Histon H4-Synthese *in vivo* gezeigt wurde, verursacht alleine ein Verlust von Nukleosomen bereits eine Aktivierung der Transkription. Wenn ein solcher Mechanismus der Aktivität des GAF zugrunde liegen sollte, so wäre eine deutliche Korrelation der durch die Konstrukte bedingten Chromatinöffnung mit der Transkriptionsaktivität am *PHO5*-Promotor zu erwarten. Aufgrund der gezeigten Diskrepanz von Chromatinöffnung und Transkriptionsaktivierung durch die beiden GAF-Konstrukte, muss davon ausgegangen werden, dass eine solche Korrelation nicht besteht. Daraus kann geschlossen werden, dass eine Derepression der Transkription, wenn sie überhaupt einen Wirkungsmechanismus des GAF darstellt, nur für einen Teil der Aktivität des GAF verantwortlich sein kann.

Die Gleichförmigkeit der Remodellierung der Chromatinstruktur durch beide Konstrukte, ist wegen der unterschiedlichen Zusammensetzung der Konstrukte ein unerwartetes Ergebnis. Das GAF2-Konstrukt enthält die POZ-Domäne und mit 121 von 185 Aminosäuren einen großen Teil der X-Domäne. Im GAF3-Konstrukt sind das C-terminale Drittel der X-Domäne gefolgt von der Zinkfinger-Domäne und der glutaminreichen Domäne enthalten. Dabei ist nach Ergebnissen von *in vitro* Untersuchungen weder die POZ-Domäne noch die glutaminreiche Domäne für die Remodellierung der Chromatinstruktur von wesentlicher Bedeutung (Agianian *et al.*, 1999). Berücksichtigt man diese Ergebnisse, erscheint es nicht plausibel, dass in einem Konstrukt zwei drittel der X-Domäne und im anderen Konstrukt ein drittel der X-Domäne zusammen mit der Zinkfinger-Domäne eine gleichartige Remodellierung der Chromatinstruktur bewirken könnten. Auffällig ist auch, dass die Chromatinstruktur durch die Disruption der Nukleosomen –1 bis –4 in der selben Weise verändert wird, wie es für eine Induktion von *PHO5* durch Phosphatmangel typisch ist. Die Publikationen von Svaren *et al.* (1994) und Then Bergh *et al.* (2000) bieten eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen. Ein Fusionsprotein aus der transaktivierenden Domäne von VP16 und der DNA-bindenden Domäne von Pho4 (Svaren *et al.*, 1994), sowie ein Fusionskonstrukt aus der transaktivierenden Domäne des humanen Glucocorticoidrezeptors und der DNA-bindenden Domäne von Pho4 (Then Bergh *et al.*, 2000) können die Chromatinstruktur am *PHO5*-Promotor öffnen. Auch in diesen Fällen zeigte sich eine Veränderung der Chromatinstruktur in der gleichen Form, wie sie bei der Induktion von *PHO5* durch Phosphatmangel vorliegt. Allen Konstrukten ist dabei die DNA-bindende Domäne von Pho4 gemein. Then Bergh *et al.* schließen, dass die DNA-bindende Domäne eines Transkriptionsaktivators entscheidende Bedeutung für die Art und den Umfang der Öffnung der Chromatinstruktur hat. Da beide Konstrukte über die gleiche DNA-bindende Domäne verfügen, könnte diese Annahme erklären, weshalb beide Konstrukte die Chromatinstruktur am *PHO5*-Promotor derart gleichförmig verändern. Diese Ergebnisse stellen damit auch einen weiteren Beleg für die von Then Berg *et al.* vorgebrachte Hypothese dar.

Auch die deutliche Aktivierung der Transkription durch beide Konstrukte stellt ein überraschendes Ergebnis dar. In bisher publizierten Arbeiten wurde für den GAF vor allem beschrieben eine indirekte Aktivierung der Transkription durch Remodellierung einer repressiven Chromatinstruktur zu bewirken (Kerrigan *et al.*, 1991;

Croston *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1993; Sandaltzopoulos *et al.*, 1995; Okada & Hirose, 1998). Neuere Publikationen zeigen jedoch auch eine von der Remodellierung der Chromatinstruktur unabhängige Aktivierung der Transkription durch GAF. Von Pile und Cartwright (2000) wurden dazu transgene *Drosophila*-Stämme untersucht. An einem minimalen *ADH*-Promotor bewirkte die Einführung einer GAF-Erkennungssequenz eine 15-fach verstärkte Aktivität der als Reporter verwendeten Luciferase. Wider Erwarten ging diese ausgeprägte Steigerung der Transkription der Luciferase nicht mit einer deutlichen Remodellierung der Chromatinstruktur einher. Das Entstehen eines DNaseI-hypersensitiven Abschnitts am *ADH*-Promotor konnte nicht nachgewiesen werden. Erst die Untersuchung des Promotors mit Micrococcus Nuklease zeigte, im Vergleich zur Kontrolle, eine Störung der regelmäßigen Anordnung der Nukleosomen. Pile und Cartwright führen an, dass die ausgeprägte Transkriptionsaktivität die Veränderung der Chromatinstruktur am Promotor ausreichend begründen könnte. Damit sind diese Ergebnisse ein Beleg für eine direkte Aktivierung der Transkription durch GAF, die nicht indirekt durch eine Remodellierung des Chromatins am Promotor zustande kommt.

Zwei weitere Publikationen belegen, dass GAF die Transkription unmittelbar aktivieren kann. Vaquero *et al.* (2000) zeigten die Transkriptionsaktivierung durch GAF *in vitro*. Da das Reporterkonstrukt als freie, nicht in einer Chromatinstruktur rekonstituierte DNA vorlag, konnte die beobachtete Aktivierung der Transkription nicht auf eine Derepression durch Remodellierung der Chromatinstruktur zurückzuführen sein. Mit Hilfe von Deletionsvarianten des GAF konnten Vaquero *et al.* zeigen, dass die Aktivierung der Transkription im wesentlichen durch die glutaminreiche Domäne des GAF vermittelt wird. Die Autoren konnten diese Aktivität der glutaminreichen Domäne durch *in vivo* Experimente mit Fusionskonstrukten aus der glutaminreichen Domäne und der DNA-bindenden Domäne von Gal4 weiter belegen. Besonders bemerkenswert sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von Agianian *et al.* (1999). Sie belegen, dass die glutaminreiche Domäne für die Remodellierung der Chromatinstruktur durch GAF nicht entscheidend ist. Die Resultate von Vaquero *et al.* und Agianian *et al.* erlauben eine strukturelle Trennung der Abschnitte des GAF, die für die Chromatinöffnung und Transkriptionsaktivierung verantwortlich sind. Damit steht eindeutig fest, dass der GAF auch als klassischer Transkriptionsaktivator, das heißt nicht über eine Derepression der Transkription, wirken kann. Die deutliche Aktivierung der Transkription durch die GAF-

Konstrukte am *PHO5*-Promotor kann somit erklärt werden. Gleichzeitig bestätigen diese Resultate, dass der GAF auch als klassischer Transkriptionsaktivator wirken kann. Allerdings besteht auch ein Widerspruch zwischen den Daten von Vaquero *et al.* und den Ergebnissen der hier vorgelegten Untersuchung der GAF-Konstrukte am *PHO5*-Promotor. Vaquero *et al.* weisen der glutaminreichen Domäne die transkriptionsaktivierende Aktivität des GAF zu. Am *PHO5*-Promotor bewirkt aber das GAF2-Konstrukt, welches neben der DNA-bindenden Domäne von Pho4 die POZ-Domäne und einen großen Teil der X-Domäne enthält, eine deutliche Aktivierung der Transkription. Bei verstärkter Expression und Induktion durch Phosphatmangel führt die Aktivierung der Transkription durch das GAF2-Konstrukt sogar zu dreifach höheren Phosphataseaktivitäten als beim GAF3-Konstrukt. Dabei enthält das GAF3-Konstrukt die glutaminreiche Domäne. Der Widerspruch zwischen diesen Daten und den Ergebnissen von Vaquero *et al.* kann jedoch aufgelöst werden. Die Autoren beschreiben auch für eine Deletionsvariante des GAF mit fehlender glutaminreicher Domäne eine, wenn auch im Vergleich mit GAF deutlich reduzierte, Aktivierung der Transkription *in vitro*. Die isolierte DNA-bindende Domäne bewirkte in diesen Experimenten keine Aktivierung der Transkription. Daraus kann man schließen, dass neben der Aktivierung der Transkription durch die glutaminreiche Domäne, auch die POZ- oder die X-Domäne in der Lage sein müssen, die Transkription zu aktivieren. Für ZF5, ebenfalls ein Mitglied der Familie der Zinkfingerproteine mit POZ-Domänen, wurde eine durch die POZ-Domäne vermittelte, transkriptionsaktivierende Wirkung beschrieben (Kaplan & Calame, 1997). Die POZ-Domäne des GAF könnte also für die beobachtete Aktivierung der Transkription durch die GAF2-Konstrukte verantwortlich sein.

Eine Reihe von Publikationen bietet eine mögliche Erklärung für den Umstand, dass die Wirkung des GAF als klassischer Transaktivator erst vergleichsweise spät erkannt worden ist. Es konnte gezeigt werden, dass GAF mit einer Vielzahl von Proteinen interagiert, die ebenfalls eine POZ-Domäne besitzen. Durch Koimmunopräzipitation konnte die Interaktion von GAF mit dem Batman Protein *in vivo* nachgewiesen werden (Faucheux *et al.*, 2003). Für das Pipsqueak Protein (Psq) wurde ebenfalls durch Koimmunopräzipitation eine Interaktion mit GAF *in vivo* gezeigt (Schwendemann & Lehmann, 2002). Durch *in vitro* Bindungsstudien konnten die Autoren demonstrieren, dass für die Interaktion von Psq und GAF die POZ-Domänen beider Proteine notwendig sind. Pagans *et al.* (2002) konnten für das

tramtrack Protein (TTK) ebenfalls eine Wechselwirkung mit dem GAF und daraus resultierende Folgen für die Aktivität des GAF nachweisen. Sie zeigten die Interaktion *in vivo* durch Koimmunopräzipitation. Die Vermittlung dieser Interaktion durch die POZ-Domänen beider Proteine wurde durch *Yeast two-hybrid* Experimente nachgewiesen. Besonders interessant sind die Ergebnisse der funktionellen Folgen der Interaktion von TTK und GAF *in vivo*. Durch Transfektionsexperimente konnte gezeigt werden, dass GAF am *eve stripe 2* Promotor eines Reporterkonstruktes Transkriptionsaktivierung bewirkt, während die Kotransfektion von TTK zu einer Repression der Transkription führte. Durch die Untersuchung von Deletionsvarianten und chimären Konstrukten von GAF und TTK konnten die Autoren belegen, dass diese Repression durch die Interaktion von GAF und TTK bewirkt wird und ebenfalls von den POZ-Domänen beider Proteine abhängt. Die Erkenntnisse hinsichtlich der Interaktion von GAF mit verschiedenen POZ-Domänen Proteinen und die Demonstration der funktionellen Konsequenzen am Beispiel des TTK, zeigen ein Problem bei der Interpretation vieler funktioneller Experimente mit dem GAF auf. Man muss befürchten, dass *in vitro* Untersuchungen unter Verwendung von Proteinpräparationen aus *D. melanogaster* oder *in vivo* Experimente in *D. melanogaster* in vielen Fällen keine Aussage über die Aktivität des GAF, sondern vielmehr über die Aktivität eines Proteinkomplexes aus GAF mit einem oder mehreren anderen POZ-Domänen Proteinen treffen. Dies könnte erklären, weshalb die Wirkung des GAF als klassischer Transaktivator zunächst nicht beobachtet wurde. Daraus folgt auch, dass heterologe Systeme für die Untersuchung der grundlegenden Eigenschaften des GAF und die gezielte Untersuchung von Interaktionen mit bestimmten Proteinen besonders vorteilhaft sind. In solchen heterologen Systemen ist die Wahrscheinlichkeit verfälschter Ergebnisse, aufgrund unerwünschter Interaktionen mit anderen POZ-Domänen Proteinen, zumindest reduziert. Insbesondere *S. cerevisiae* als Modellsystem dürfte, aufgrund der denkbar geringen Verwandtschaft mit *D. melanogaster*, mit großer Wahrscheinlichkeit keine unerwünschten Interaktionspartner für GAF enthalten. Daher spiegeln Ergebnisse aus diesem System, wie sie im Rahmen dieser Arbeit vorgelegt werden, auch am ehesten die Aktivitäten des GAF selbst wider.

Bei der Untersuchung der durch die GAF-Konstrukte bewirkten Aktivierung der Transkription ergibt sich für das GAF2-Konstrukt ein auffälliges Ergebnis. Beim verstärkt exprimierten GAF2-Konstrukt führt die Induktion von *PHO5* durch Phos-

Klon / Stamm	Anstieg der Phosphataseaktivität
YS31	3,5
pP4-12-GAF2 in YS33	1,7
pP4-12-GAF3 in YS33	2,4
pP4-72-GAF2 in YS33	5,1
pP4-72-GAF3 in YS33	1,8

Tabelle 3.1:

Die Tabelle zeigt aus den Werten der Tabelle 2.2 errechnete Durchschnittswerte für den Anstieg der Phosphataseaktivität nach Induktion durch Phosphatmangel bei einer Auswahl der untersuchten Stämme und Konstrukte.

phatmangel zu einem besonders hohen Anstieg der Phosphataseaktivitätswerte im Vergleich zur Aktivität ohne Induktion (siehe Tabelle 3.1). Wie aus der Tabelle zu ersehen, liegt dieser fünffache Anstieg deutlich über den Werten aller anderen Konstrukte und auch über dem dreieinhalbfachen Anstieg beim Wildtyp-Pho4 in YS31. Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass dieser hohe Anstieg nur bei verstärkter Expression des Konstrukts zu beobachten ist. Dieser Umstand liefert auch eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse. Für GAF wurde *in vitro* eine durch die POZ-Domäne bedingte Oligomerisierung nachgewiesen (Espinás *et al.*, 1999; Katsani *et al.*, 1999). Es ist deshalb vorstellbar, dass die verstärkte Expression des GAF2-Konstruktes eine Oligomerisierung des Konstruktes über die POZ-Domäne ermöglicht. Die daraus hervorgegangenen Oligomere könnten dann für den besonders deutlichen Anstieg der Phosphataseaktivität verantwortlich sein. Mit diesem Ansatz ist das beobachtete Phänomen jedoch nicht erklärt. In YS33, der mit den Konstrukten transformiert wurde, ist das *PHO80*-Gen durch eine Disruption inaktiviert. Damit ist ein Regulationsmechanismus ausgeschaltet, der bei ausreichender Phosphatversorgung zu einer Inaktivierung von Pho4 durch Phosphorylierung und Export aus dem Nukleus führt. Die Inaktivierung dieses Regulationsmechanismus führt aber nicht zu maximaler Aktivierung von *PHO5* (Madden *et al.*, 1988). Induktion von *PHO5* durch Phosphatmangel führt in *pho80*-Stämmen zu einem weiteren Anstieg der Phosphataseaktivität. Der Mechanismus, welcher zu dieser zusätzlichen Steigerung der Transkription von *PHO5* führt, ist nicht bekannt. Daraus folgt, dass

die besonders ausgeprägte Steigerung der Phosphataseaktivität bei dem verstärkt exprimierten GAF2-Konstrukt auf eine Interaktion mit diesem bisher nicht charakterisierten Regulationsmechanismus zurückzuführen sein muss. Die Annahme einer möglichen Oligomerisierung des Konstruktes ist zwar naheliegend, die Bedeutung einer solchen Oligomerisierung ist ohne Kenntnis des besagten Regulationsmechanismus jedoch nicht zu belegen.

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten chimären Konstrukte und die Ergebnisse der mit diesen Konstrukten durchgeführten Experimente führen zu Erkenntnissen über Eigenschaften des *PHO5*-Promotors und des GAF.

Die Beobachtungen zur Chromatinöffnung durch die GAF-Konstrukte bieten einen weiteren Beleg für die wesentliche Bedeutung der DNA-bindenden Domäne eines Transkriptionsaktivators für die Remodellierung der Chromatinstruktur.

Es konnte auch bestätigt werden, dass der GAF, wie ein klassischer Transkriptionsaktivator, eine Aktivierung der Transkription bewirken kann, die mit einer Derepression des Promotors nicht erklärt werden kann.

Der GAF muss neben der glutaminreichen Domäne über eine weitere Domäne verfügen, die *in vivo* eine ausgeprägte Aktivierung der Transkription bewirken kann. Diese Erkenntnis ist grundsätzlich neu.

4. Material und Methoden

4.1 DNA

Die Plasmide pP4-12, pP4-72 und pP4-70 stammen aus der eigenen Arbeitsgruppe. Das Plasmid mit der kodierenden Sequenz für den GAGA-Faktor wurde von P. Varga-Weisz, EMBL – Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Das Plasmid Bluescript-SK⁻ stammt von Stratagene, Heidelberg.

Isolierte DNA des Lambda-Bakteriophagen wurde von Boehringer, Mannheim, bezogen.

Das als Sonde D bezeichnete DNA-Fragment (beschrieben in Almer & Hörz (1986)) stammt aus der eigenen Arbeitsgruppe.

4.2 Oligonukleotide

PD97-106: GGACTGGATGATGCCCTCGCATATCAAGCCGCGGCTAT

PD101-110: CGCATGCGCACCACTCCCTATTATATTCGCCGC

P-rev: CACGTGCTCCCGTTC

P-for: GAAAGGCTGACCCGG

P-sequ: TTGGACGACCTAGAC

GAF-for: GCGAATTCATTCGCTGTATTCGC

GAF-rev: GAAAGCTTAGATCTCTGCGGCTGCGGCTG

T3: ATTAACCCTCACTAAG

T7: AATACGACTCACTATAG

P-for: GAAAGGCTGACCCGG

Alle Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech, Ebersberg bezogen.

4.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase (Shrimp)	United States Biochemical Cleveland, Ohio, USA
DNaseI	Boehringer, Mannheim
Klenow-Enzym (Klenow-Fragment der DNA-Pol I)	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Restriktionsnukleasen	Boehringer, Mannheim und New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA

RNase A	Boehringer, Mannheim
Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit	United States Biochemical Cleveland, Ohio, USA
Taq-Polymerase	Boehringer, Mannheim
T4-DNA Ligase	Boehringer, Mannheim
T4-DNA Polymerase	Boehringer, Mannheim
Zymolase 100T ICN	Immuno Biolog. Costa Mesa, CA, USA

4.4 Chemikalien

α - ³² P-dATP	Du Pont de Nemours, NEN, Division Dreieich
α - ³⁵ S-dATP	Du Pont de Nemours, NEN, Division Dreieich
Agarose (SeaKem)	FMC Bio Products, Rockland, ME, USA
Aminosäuren	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxidisulfat	E. Merck, Darmstadt
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Bacto-Agar, -Trypton, -Pepton, -Yeast Extrakt	Difco Laboratories Detroit, Michigan, USA
Bromphenolblau	E. Merck, Darmstadt
Desoxyribonukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Dimethyldichlorsilan	BDH Chemicals Ltd., Pool, England
Dithiothreitol (DTT)	Boehringer, Mannheim
Ethidiumbromid	E. Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Dinatriumsalz	E. Merck, Darmstadt
Glucose	E. Merck, Darmstadt
Harnstoff	Serva, Heidelberg
Hefeextrakt	E. Merck, Darmstadt
Lachs-Sperma-DNA	Serva, Heidelberg
β -Mercaptoethanol	E. Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	E. Merck, Darmstadt
3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure (MOPS)	Sigma, Deisenhofen
o-Nitro-Phenylphosphat (ONPP)	Boehringer, Mannheim
Polyethylenglycol	Sigma, Deisenhofen
Polyvinylpyrrolidon	Sigma, Deisenhofen

Random-Primer p(dN) ₆	Boehringer, Mannheim
Sequagel-(XR)-Fertiglösung 6 %	National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA
Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

4.5 Andere Materialien

Nylonmembranen	Pall Filtrationstechnik, Dreieich
Qiagensäulen zur DNA-Reinigung	Qiagen, Düsseldorf
Röntgenfilme Fuji RX	Fuji Photo Co., Tokyo, Japan
Sephadex G-50	Pharmacia LKB, Freiburg
Verstärkerschirme Curix MR 600	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Whatman, 3MM-Papier	Whatman Limited, Springfield
	Mill Maidstone Kentucky USA

4.6 Kulturmedium für *E. coli*

LB₀-Medium:

10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl

Platten: 20 g Agar/l Medium

Bei Bedarf 200 mg/l Ampicillin

4.7 Kulturmedien für *S. cerevisiae*

YPDA-Vollmedium:

1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Pepton, 2 % (w/v) Glucose, 100 mg/l Adenin

Platten: 20 g Agar/l Medium

YNB-phosphathaltiges Minimalmedium:

6,7 g/l Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids, 100 mg Adenin, 2 % (w/v) Glucose,
1,6 g/l

Aminosäuren dropout; der pH wird durch Zugabe von 5 M NaOH auf 5,4 eingestellt

Platten: 20 g Agar/l Medium

Phosphatfreies Minimalmedium:

2 g/l L-Asparagin, 500 mg/l MgSO₄ x H₂O, 100 mg/l NaCl, 100 mg/l CaCl₂ x 2H₂O,
100 mg/l Adenin, 500 µg/l H₃BO₃, 40 µg/l CuSO₄ x H₂O, 100 µg/l KJ, 200 µg/l
FeCl₃ x 6H₂O, 400 µg/l MnSO₄ x H₂O, 200 µg/l (NH₄)₆Mo₇O₂₇ x 4H₂O, 200 µg/l

ZnSO₄ x 7H₂O, 2 mg/l Inositol, 200 µg/l Riboflavin, 200 µg/l p-Aminobezoesäure, 2 µg/l Biotin, 2 µg/l Folsäure, 400 µg/l Nicotinsäureamid, 400 µg/l Pyridoxin-HCl, 400 µg/l Thiaminchlorid, 13,4 mM KCl, 20 mM Natriumcitrat pH = 5,0, 2 % (w/v) Glucose, 1,6 g/l Aminosäure drop out; siehe auch (Svaren *et al.*, 1995)

Aminosäure drop out:

2 g Adenin, 2 g Alanin, 2 g Arginin, 2 g Asparagin, 2 g Aspartat, 2 g Cystein, 2 g Glutamin, 2 g Glutamat, 2 g Glycin, 2 g meso-Inosit, 2 g Isoleucin, 2 g Lysin, 2 g Methionin, 0,2 g p-Aminobenzoesäure, 2 g Phenylalanin, 2 g Prolin, 2 g Serin, 2 g Threonin, 2 g Tryptophan, 2 g Tyrosin, 2 g Valin.

Histidin (2 g), Uracil (2 g) und Leucin (4 g) nach Bedarf zuzusetzen.

4.8 Bakterienstamm

Der verwendete *E. coli* Stamm 490A (mit dem Genotyp: r_K, m_K, met⁻, thr⁻, leu⁻, recA⁻) stammt von G. Hobom, Gießen

4.9 Hefestämme

YS31 (*MATa*; *his3-11*, *his3-15* ; *leu2-3*, *leu2-112*, *can^R*, *ura3Δ5*, *Δpho80::HIS3*) und

YS33 (*MATa*; *his3-11*, *his3-15* ; *leu2-3*, *leu2-112*, *can^R*, *ura3Δ5*, *pho4::ura3Δ5*, *Δpho80::HIS3*) stammen aus der Arbeitsgruppe (Svaren *et al.*, 1995).

4.10 Molekulare Klonierung von DNA

Standardtechniken wie Restriktionsspaltungen von DNA, Dephosphorylierung und Ligierung von DNA-Fragmenten wurden nach Maniatis (Maniatis *et al.*, 1982) durchgeführt. Die Transformation von Hitzeschock-kompetenten *E. coli* erfolgte ebenfalls nach Maniatis. Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelstücken erfolgte mittels Zentrifugation durch Filterpapier (Schleicher und Schüll, Dassel) sowie Aufreinigung der DNA aus dem Filtrat durch Ethanolfällung.

4.11 Kompetenzinduktion von *E. coli*-Bakterien

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien nach der CaCl₂-Methode (Dagert and Ehrlich, 1979) wurden 100 ml einer logarithmisch gewachsenen Bakterienkultur bei einer OD₆₀₀ von 0,1 bis 0,5 abzentrifugiert und in 30 ml TFBI-Puffer (30 mM KAc,

50 mM MnCl₂, 100 mM KCl, 15 % [w/V] Glycerin, pH = 5,8) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (2500 rpm; 5°C, 5 min) wurden die Zellen in 4 ml eiskaltem TFBII-Puffer (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15 % (w/V) Glycerin, pH = 7,0) resuspendiert und aliquotiert. Tiefgefroren bei -80°C sind diese Bakterien bis zu einem Jahr hochkompetent.

4.12 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

20 µl eines Ligierungsansatzes wurden mit 30 µl TMC-Puffer (10 mM Tris pH 7,5; 10 mM MgCl₂) auf 100 µl Suspension kompetenter *E. coli* pipettiert und eine Stunde in Eis inkubiert. Die Bakterien wurden einem Hitzeschock bei 42°C für 2 Minuten und anschließend einer einstündigen Inkubation in LB-Medium bei 37°C unterzogen, abzentrifugiert, auf ampicillinhaltigen Agarplatten (200 mg/l Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.13 Plasmidpräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab, entsprechend einem Kulturvolumen von 5 ml, wurde mit einem Schnellpräparationsverfahren (Birnboim & Doly, 1979) durchgeführt. Zur Gewinnung größerer Mengen von Plasmid-DNA wurde das *Plasmid Midi-Kit* der Quiagen GmbH, Hilden, nach Maßgabe des Herstellers verwendet.

4.14 DNA-Sequenzierung

Sequenziert wurde Plasmid-DNA nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977). Dabei wurde der Sequenase DNA Sequencing Kit der Firma USB nach Maßgabe des Herstellers verwendet. Nach fünf Minuten Denaturierung bei 95°C wurden die mit ³⁵S markierten Fragmente in 6%igen PAA-Gelen (20 x 40 cm) mit 7 M Harnstoff aufgetrennt. Als Laufpuffer diente Tris/Boratpuffer (100 mM Tris, 83 mM Borsäure, 1 mM EDTA pH 8,8). Mit dem getrockneten Gel wurde anschließend ein Röntgenfilm exponiert. Die Nukleotid-Sequenz konnte anhand des entwickelten Filmes bestimmt werden.

4.15 Polymerasekettenreaktion

In einen PCR-Ansatz wurden ATP, GTP, CTP und TTP zu je 200 µM und Primer in der Konzentration von 0,2 µM eingesetzt. Bei einem Reaktionsvolumen von 50 µl

wurden etwa 2,5 ng Matritzen-DNA (bei einem linearisierten Plasmid mit einer Größe von 3000 bis 5000 Basenpaaren), 1 µl Taq-Polymerase und 5 µl 10-fach Puffer (Roche, mitgeliefert zur Taq-Polymerase) eingesetzt.

Die Probe wurde in einer PCR-Maschine nach einer initialen Denaturierung von 3 Minuten bei 95°C für 30 Zyklen zu je 1 Minute bei 95°C gefolgt von 1 Minute bei 50°C und 3 Minuten bei 72°C inkubiert. Das PCR-Programm wurde mit 5 Minuten bei 72°C abgeschlossen.

4.16 Megaprimer PCR

Der erste Reaktionsschritt der Megaprimer-Methode (nach Sarkar & Sommer, 1991) wurde als PCR nach dem unter 4.15 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Das isolierte PCR-Produkt wurde als Megaprimer in einer Konzentration von 0,1µM in den Ansatz der zweiten PCR eingesetzt. Um die Wahrscheinlichkeit der Bindung des als Doppelstrang-DNA vorliegenden Megaprimers an die Matrizen-DNA zu erhöhen, wurde die Matrizen-DNA in erhöhter Konzentration eingesetzt. Dazu wurde bei einem Reaktionsvolumen von 50µl 1µg der Matrizen-DNA (Plasmid mit einer Größe von etwa 6500 Basenpaaren) eingesetzt. Alle anderen Reaktionsbedingungen entsprechen dem unter 4.15 beschriebenen Protokoll.

4.17 Hefetransformation

Die Transformation von Plasmid-DNA in logarithmisch wachsende Hefezellen erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode (Ito *et al.*, 1983). Logarithmisch gewachsene Zellen wurden zentrifugiert (4000 rpm; 5 min; 5°C), mit sterilem TE-Puffer (100mM Tris, 10mM EDTA, pH = 7,4) gewaschen und eine Zellsuspension von 30 OD₆₀₀ in sterilem TE-Puffer (pH = 7,4) hergestellt. Zu dieser wurde 0,2 M Lithiumacetat zu einer Endkonzentration von 0,1 M zugesetzt. Transformiert wurden jeweils 100 µl Zellsuspension mit 1-5 µg DNA, wobei 30 Minuten bei 30°C inkubiert wurde. Danach wurde pro Ansatz das gleiche Volumen an 60%igem, sterilen PEG zugesetzt. Nach 60-minütiger Inkubation bei 30°C wurden die Zellen einem Hitzeschock von 5 Minuten bei 42°C unterzogen. Nach dem Waschen in sterilem Wasser wurden die Zellen auf YNB-Medium-Platten ausplattiert. Die Platten enthielten dabei Zusätze von allen Aminosäuren, außer der Aminosäure auf

deren Auxotrophie hin die Selektion erfolgen sollte. Die Platten wurden für 2-5 Tage bei 30°C inkubiert.

4.18 Isolierung von Hefe-DNA

Über Nacht gewachsene Hefekulturen in 2,5 ml Vollmedium oder 10 ml Minimalmedium wurden mit 4000 Umdrehungen abzentrifugiert und in 250 µl Sorbit/β-Mercaptoethanol-Lösung (0,9 mM Sorbit; 140 mM Mercaptoethanol in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH = 7,4) mit 400 µg/ml Zymolase 100T für 40 Minuten bei 37°C lysiert. Nach 30 Minuten Proteinase-K-Inkubation (EDTA (Endkonzentration 30 mM), SDS (Endkonzentration 2 %) und 2 mg/ml Proteinase K) wurde die Probe nach Zugabe von NaClO₄ (Endkonzentration 1M) einmal mit 1:1 Phenol/Chloroform (1:24 Isoamylalkohol : Chloroform) und danach einmal mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach einer Ethanol-fällung der wässrigen Phase erfolgte der RNA-Abbau in einer 8%igen Rnase-A-Lösung; die DNA wurde mit Isopropanol gefällt und in TE-Puffer pH = 8,0 resuspendiert.

4.19 Messung der sauren Phosphataseaktivität

Logarithmisch gewachsene Hefekulturen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 1-2 kultiviert. Es wurde dann ein entsprechendes Volumen der Kultur abgenommen und die Zellen nach Zentrifugation in 2 ml 0,1 M Natriumacetat pH = 3,6 aufgenommen. Das Volumen der Kultur wurde so gewählt, dass nach der Resuspension eine optische Dichte von 2 OD₆₀₀ vorlag. Bei Zellen nach Induktion durch Phosphatmangel (Induktion erfolgte durch Animpfen einer Kultur in phosphatfreiem Medium mit einer OD₆₀₀ von 0,2 mit Zellen aus einer logarithmisch wachsenden Kultur [normale Phosphatkonzentration] nach zweimaligem Waschen mit bidestilliertem, sterilem H₂O) oder Hefestämmen mit einem *pho80*-Genotyp wurde das Volumen so gewählt, dass nach der Resuspension eine optische Dichte von 0,25 OD₆₀₀ vorlag. 1 ml der Zellsuspension wurde zur OD₆₀₀-Bestimmung verwendet und 1 ml mit 1 ml 20 mM o-Nitro-Phenylphosphat in 0,1 M Natriumacetat, pH = 3,6 bei 30°C für 10 Minuten inkubiert. Beendet wurde die Reaktion durch Zusatz von 0,5 ml 1 M NaOH. Nach Zentrifugation der Zellsuspension wurde die Absorption des zellfreien Überstandes bei 410 nm gemessen.

$$\text{Aktivität der sauren Phosphatase (U/OD}_{600}) = \frac{\Delta OD_{410} * 1000}{OD_{600} / ml * V[ml] * t[\text{min}]}$$

4.20 Isolierung von Hefezellkernen

Für Kernpräparationen bei Induktion durch Phosphatmangel wurden Vorkulturen in phosphathaltigem Medium angesetzt. Aus diesen Vorkulturen wurden logarithmisch wachsende Zellen gewonnen. Diese Zellen wurden zweimal mit bidestilliertem, sterilen Wasser gewaschen. Die Zellen wurden dann verwendet um 500 ml phosphatfreies Medium mit einer Zelldichte von 0,35-0,5 OD₆₀₀ anzuimpfen. Nach Inkubation über Nacht bei 30°C erfolgte die Zellkernisolierung, wenn die Zellen eine OD₆₀₀ von 1 bis 4 erreicht hatten. Die Isolierung von Hefezellkernen wurde durchgeführt wie von Gregory et al. (1998, 2) beschrieben.

4.21 ClaI-Spaltung von Chromatin

Ein Pellet, entsprechend einem Nassgewicht von 100mg, aus einer Kernpräparation wurde in 1ml Reaktionspuffer [10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,2 mM EGTA, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM Spermidin, 0,15 mM Spermin, 5 mM CaCl₂, 1 mM β-Mercaptoethanol] resuspendiert. Die Suspension wurde auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt und für 1 Minute bei 10000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl Reaktionspuffer resuspendiert. Diese Proben wurden mit ClaI in einer Endkonzentration von 100 U/ml und 400 U/ml versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 mM Tris-HCl (pH 8,8), 15 mM EDTA (pH 8,0), 0,5 % SDS und 20 µl Proteinase K Lösung [10mg/ml Proteinase K gelöst in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)] gestoppt. Die Proben wurden dann für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch die folgenden Schritte isoliert. Zugabe von NaClO₄ (Endkonzentration 1 M) gefolgt von Ausschütteln mit 1:1 Phenol/Chloroform (1:24 Isoamylalkohol : Chloroform) sowie anschließend ausschütteln mit Chloroform. Nach einer Ethanolfällung der wässrigen Phase erfolgte der RNA-Abbau in einer 8%igen Rnase-A-Lösung; die DNA wurde mit Isopropanol gefällt und in 50 µl TE pH = 8,0 resuspendiert. 10 µl des Ansatzes wurden dann mit 5 U/ml BspRI mit dem entsprechenden Reaktionspuffer

nachgespalten. Die Proben konnten dann in Agarosegelelektrophoresen aufgetrennt und mit einem nachfolgenden Southernblot untersucht werden (siehe 4.23).

4.22 DNaseI-Spaltung von Chromatin

Ein Pellet aus einer Kernpräparation von 500mg Hefezellen wurde in 3 ml Reaktionspuffer [15 mM Tris-HCl (pH 7,5), 75 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0,05 mM CaCl₂, 1 mM β -Mercaptoethanol] resuspendiert. Die Suspension wurde für 5 Minuten bei 2000 g und 5°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1,2 ml Reaktionspuffer resuspendiert. Jeweils 200 μ l der Suspension wurden in ein Reaktionsgefäß überführt. Fünf dieser Proben wurden mit DNaseI (verdünnt in einem Puffer [10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 0,1 mg/ml Bovines Serum Albumin]) in einer Endkonzentration von 0,25 U/ml, 0,5 U/ml, 1 U/ml, 2 U/ml und 4 U/ml versetzt und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die sechste Probe wurde ohne DNaseI bei 0°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μ l einer Lösung 1 M Tris-HCl (pH 8,8), 4 μ l 0,2M EDTA (pH 8,0), 5 μ l 20 % SDS und 20 μ l Proteinase K Lösung [10 mg/ml Proteinase K gelöst in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)] gestoppt. Die Proben wurden dann für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch die folgenden Schritte isoliert. Zugabe von NaClO₄ (Endkonzentration 1 M) gefolgt von ausschütteln mit 1:1 Phenol/Chloroform (1:24 Isoamylalkohol : Chloroform) sowie anschließend ausschütteln mit Chloroform. Nach einer Ethanolfällung der wässrigen Phase erfolgte der RNA-Abbau in einer 8 %igen Rnase-A-Lösung; die DNA wurde mit Isopropanol gefällt und in 80 μ l TE (pH = 8,0) resuspendiert. 40 μ l des Ansatzes wurden dann mit 20 U/ml ApaI mit dem entsprechenden Reaktionspuffer nachgespalten. Die Proben konnten dann in Agarosegelelektrophoresen aufgetrennt und mit einem nachfolgenden Southernblot untersucht werden (siehe 4.23).

4.23 Auftrennung von DNA in Agarosegelen; Southern Transfer auf geladene Nylonmembranen und Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA

Analytische Gele enthielten 0,6-2,0 % w/v Agarose in 1xTEB-Puffer (90 mM Tris-HCl, 2,5 mM EDTA (Na)₂, 90 mM Borsäure, pH 8,3). Die Elektrophorese wurde mit horizontalen Gelen bei einer Spannung von 100-200 V durchgeführt. Präparative Gele enthielten 0,6-1,5 % w/v-Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA(Na)₂, pH 7,4). Die Elektrophorese wurde mit horizontalen

Gelen bei einer Spannung von 100-200 V durchgeführt. Für einen späteren Southern Transfer wurde die DNA auf präparative Gele aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit vertikalen und wassergekühlten Gelen bei einer Spannung von 100-200 V durchgeführt. Nach der Gelelektrophorese wurden diese Gele 15 Minuten in Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl; 0,1 M NaOH) unter vorsichtigem Schütteln behandelt. Der DNA-Transfer erfolgte über Nacht auf die zunächst in Wasser und dann in 20 x SSC äquilibrierte Nylonmembran (Pall) in 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat). Anschließend wurde die Membran prähybridisiert, und zwar in 500 ml 3 x SSC/1xDenhardt 2 Stunden bei 68°C, weitere 2 Stunden in einem rotierenden Zylinder in 25 ml 3 x SSC/1xDenhardt (0,5 % SDS, 1 mM EDTA (Na)₂, 0,02 % Rinderserumalbumin, 0,02 % Ficoll, 0,02 % Polyvinylpyrrolidon) und 50 µg/ml gescherter Lachsspermien-DNA. Die Membran wurde danach mit einer radioaktiv markierten Sonde für 16 Stunden im rotierenden Zylinder in 4 ml 3 x SSC, 1 x Denhardt mit 50 µg/ml gescherter Lachsspermien-DNA hybridisiert. Die Membran wurde je einmal in 500 ml 2 x SSC, 1 x Denhardt und 500 ml 2 x SSC, 0,5 % SDS bei 68°C abgewaschen und in 2 x SSC gespült. Ein Röntgenfilm wurde mit der in Haushaltsfolie verpackten Membran und einem Verstärkerschirm (Curix MR600) für eine Stunde bis mehrere Tage bei -70°C exponiert.

4.24 Random primed labeling

Als DNA-Sonde wurde für den Nachweis der transformierten Plasmide das beschriebene HindIII-XbaI Fragment aus pP4-70 (siehe 2.2.6) und für die Detektion der *PHO5*-Promotorfragmente aus der ClaI- und DNaseI-Spaltung das als Sonde D in Almer & Hörz (1986) beschriebene DNA-Fragment verwendet. Diese Sonden wurden, wie in Feinberg & Vogelstein (1983) beschrieben, radioaktiv markiert. Dazu wurde α -³²P-dATP mit einer spezifischen Aktivität von 800 Ci/mmol (New England Nuclear, Dreieich) verwendet.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Fragen zur Wechselbeziehung von Struktur und Funktion von Transkriptionsaktivatoren am *PHO5*-Promotor in *Saccharomyces cerevisiae* bearbeitet.

Im ersten Teil der Arbeit wurden zwei Deletionsmutanten des Transkriptionsfaktors Pho4 hergestellt und charakterisiert. Dazu wurden aus der *PHO4*-Sequenz mit Hilfe einer PCR-gestützten Methode jeweils die für die Aminosäuren 97 bis 106 sowie 101 bis 110 kodierenden Sequenzen entfernt. Mit Hilfe von geeigneten Expressionsvektoren wurden beide Deletionsmutanten in *S. cerevisiae* exprimiert. Das Ausmaß der Transkriptionsaktivierung durch die Konstrukte wurde durch Messung der Aktivität der sauren Phosphatase bestimmt. Beide Mutanten bewirkten eine deutliche Aktivierung der Transkription am *PHO5*-Promotor. Daraus kann geschlossen werden, dass die hier deletierten Abschnitte von *PHO4* keinen wesentlichen Anteil an der Transkriptionsaktivierung durch Pho4 haben. Zwischenzeitlich wurde der Nachweis einer minimalen transkriptionsaktivierenden Domäne von Pho4 publiziert. Die minimale transaktivierende Domäne besteht aus den Aminosäuren 79 bis 99. Dieser Abschnitt ist notwendig und ausreichend für die Öffnung der Chromatinstruktur des Promotors und die Aktivierung der Transkription. Die hier beschriebene Herstellung und Charakterisierung der Deletionsmutanten von *PHO4* leistete einen wesentlichen Beitrag zur Eingrenzung der transaktivierenden Domäne von Pho4.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit der Wirkung des als GAGA-Faktor (GAF) bezeichneten Transkriptionsfaktors aus *Drosophila melanogaster* am *PHO5*-Promotor von *S. cerevisiae*. Dazu wurden chimäre Konstrukte aus dem GAF und der DNA-bindende Domäne des Transkriptionsaktivators Pho4 hergestellt. Zudem wurden auch Fusionskonstrukte mit jeweils nur einer Hälfte des GAF und der DNA-bindende Domäne des Pho4 erzeugt. Diese Konstrukte wurden in *S. cerevisiae* exprimiert. Hier zeigte sich, dass die Verbindung aus dem gesamten GAF und der DNA-bindenden Domäne von Pho4, vermutlich aufgrund eines gestörten intrazellulären Transports oder aufgrund einer Instabilität des Proteins, keine Aktivität aufwies. Dagegen waren die Konstrukte, welche jeweils nur eine Hälfte des GAF enthielten, in der Lage, eine Öffnung der Chromatinstruktur und eine Aktivierung der Transkription am *PHO5*-Promotor zu bewirken. Um zu

untersuchen, welche Veränderungen die chimären Konstrukte durch ihr Angreifen am *PHO5*-Promotor an der Chromatinstruktur des Promotors verursachen, wurden spezielle experimentelle Verfahren angewendet. Diese nutzen die unterschiedliche Zugänglichkeit der DNA für Enzyme bei geöffneter oder geschlossener Chromatinstruktur. Die Untersuchungen zeigten eine gleichartige Öffnung der Chromatinstruktur am *PHO5*-Promotor durch beide Konstrukte. Die gleichartige Öffnung der Chromatinstruktur korrelierte dabei nicht mit dem unterschiedlichen Umfang der Transkriptionsaktivierung von *PHO5*. Aufgrund der fehlenden Korrelation von Chromatinöffnung und Transkriptionsaktivierung stehen diese Ergebnisse im deutlichen Widerspruch zu der von vielen Autoren vertretenen Hypothese, der GAF würde die Transkription indirekt, nur durch die Öffnung repressiver Chromatinstrukturen aktivieren (Derepression). Vielmehr weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass der GAF auch als klassischer Transaktivator eine direkte Aktivierung der Transkription bewirken kann. Die Aktivierung der Transkription durch beide Hälften des GAF in den chimären Konstrukten war ein überraschendes Ergebnis. Es zeigt, dass GAF neben der glutaminreichen Domäne eine weitere Domäne enthält, die in vivo eine Aktivierung der Transkription bewirken kann. Diese Erkenntnis ist grundsätzlich neu und in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.

6. Literaturverzeichnis

1. Almer, A. & Hörz, W. (1986) Nuclease hypersensitive regions with adjacent positioned nucleosomes mark the gene boundaries of the PHO5/PHO3 locus in yeast. *EMBO J.* 5:2681-2687
2. Almer, A., Rudolph, H., Hinnen, A. & Hörz, W. (1986) Removal of positioned nucleosomes from the yeast PHO5 promoter upon PHO5 induction releases additional upstream activating DNA elements. *EMBO J.* 5:2689-2696
3. Agianian, B., Leonard, K., Bonte, E., Van der Zandt, H., Becker, P.B. & Tucker, P.A. (1999) The Glutamine-rich Domain of the *Drosophila* GAGA Factor is Necessary for Amyloid Fibre Formation *in Vitro*, But Not for Chromatin Remodelling *J. Mol. Biol.* 285:527-544
4. Barbaric, S., Münsterkötter, M., Svaren, J. & Hörz, W. (1996) The homeodomain protein Pho2 and the basic-helix-loop-helix protein Pho4 bind DNA cooperatively at the yeast *PHO5* promoter *Nucleic Acids Res.* 24(22):4479-4486
5. Barbaric, S., Münsterkötter, M., Goding, C. & Hörz, W. (1998) Cooperative Pho2-Pho4 Interactions at the *PHO5* Promoter Are Critical for Binding of Pho4 to UASp1 and for Efficient Transactivation by Pho4 at UASp2. *Mol. Cell. Biol.* 18(5):2629-2639
6. Barbaric, S., Reinke, H. & Hörz, W. (2003) Multiple mechanistically distinct functions of SAGA at the PHO5 promotor. *Mol. Cell. Biol.* 23(10):3468-3476
7. Barbaric, S., Walker, J., Schmid, A., Svejstrup, J.W. & Hörz, W. (2001) Increasing the rate of chromatin remodelling and gene activation – a novel role for the histone acetyltransferase Gcn5. *EMBO J.* 20(17):4944-4951
8. Becker, P.B. (1995) *Drosophila* chromatin and transcription. *Semin Cell Biol.* 6(4):185-190
9. Benyajati, C., Mueller, L., Xu, N., Pappano, M., Gao, J., Mosammaparast, M., Conklin, D., Granok, H., Craig, C. & Elgin, S.C.R. (1997) Multiple isoforms of GAGA factor, a critical component of chromatin structure. *Nucleic Acids Res.* 25(16):3345-3353

10. Berben, G., Legrain, M. & Hilger, F. (1988) Studies on the structure, expression and function of the yeast regulatory gene PHO2. *Gene* 66:307-312
11. Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1515
12. Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. & Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci* 69:2110-2115
13. Croston, G.E., Kerrigan, L.A., Lira, L.M., Marshak, D.R. & Kadonaga, J.T. (1991) Sequence-Specific Antirepression of Histone H1-Mediated Inhibition of Basal RNA Polymerase II Transcription. *Science* 251:643-649
14. Drysdale, C.M., Dueñas, E., Jackson, B.M., Reusser, U., Braus, G.H. & Hinnebusch, A.G. (1995) The transcriptional activator Gcn4 contains multiple activation domains that are critically dependent on hydrophobic amino acids *Mol. Cell. Biol.* 15:1220-1233
15. Espinás, M.L., Jiménez-García, E., Vaquero, A., Canudas, S., Bernués, J. & Azorín, F. (1999) The n-terminal POZ domain of GAGA mediates the formation of oligomers that bind DNA with high affinity and specificity. *J. Biol. Chem.* 275(23):16461-16469
16. Farkas, G., Gausz, J., Galloni, M., Reuters, G., Gyurkovics, H. & Karch, F. (1994) The Trithorax-like gene encodes the *Drosophila* GAGA Factor. *Nature* 371:806-808
17. Fascher, K.D., Schmitz, J., Hörz, W. (1990) Role of trans-activating proteins in the generation of active chromatin at the *PHO5* promoter in *S. cerevisiae*. *EMBO J.* 9(8):2523-2528
18. Fascher, K.D., Schmitz, J., Hörz, W. (1993) Structural and Functional Requirements for the Chromatin Transition at the *PHO5* Promoter in *Saccharomyces cerevisiae* upon *PHO5* Activation. *J. Mol. Biol.* 231:658-667
19. Faucheux, M., Roignant, J.Y., Netter, S., Charollais, J., Antoniewski, C. & Theodore, L. (2003) batman interacts with Polycomb and trithorax Group genes and encodes a BTB/POZ protein that is included in a complex containing GAGA factor *Mol. Cell. Biol.* 23(4):1181-1195

20. Feinberg, A.P. & Vogelstein (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6
21. Gaudreau, L., Schmid, A., Blaschke, D., Ptashne, M. & Hörz, W. (1997) RNA Polymerase II Holoenzyme recruitment is sufficient to remodel chromatin at the yeast *PHO5* promoter. *Cell* 89:55-62
22. Gregory, P.D., Schmid, A., Zavari, M., Lui, L., Berger, S.L. & Hörz, W. (1998, 1) Absence of Gcn5 HAT activity defines a novel state in the opening of Chromatin at the *PHO5* Promoter in Yeast *Mol. Cell* 1:495-505
23. Gregory, P.D., Barbaric, S. & Hörz, W. (1998, 2) Analyzing chromatin structure and transcription factor binding in yeast *Methods* 15:295-302
24. Grant, P.A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C.D., Winston, F., Berger, S.L. & Workman, J.L. (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: Characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt-Ada) complex. *Genes Dev.* 11:1640-1650
25. Haguenaue-Tsapis, R. & Hinnen, A. (1984) A deletion that includes the signal peptidase cleavage site impairs processing, glycosylation, and secretion of cell surface yeast acid phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* 4:2668-2675
26. Han, M., Kim, U.J., Kayne, P. & Grunstein, M. (1988) Depletion of histone H4 and nucleosomes activates the *PHO5* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 7:2221-2228
27. Haswell, E.S. & O'Shea E.K. (1999) An in vitro system recapitulates chromatin remodeling at the *PHO5* promoter *Mol. Cell. Biol.* 19:2817-2827
28. Hirst, K., Fischer, F., McAndrew, P.C. & Goding, C.R. (1994) The transcription factor, the Cdk, its cyclin and their regulator: directing the transcriptional response to a nutritional signal. *EMBO J.* 13:5410-5420
29. Jayaraman, P.S., Hirst, K. & Goding, C. R. (1994) The activation domain of a basic helix-loop-helix protein is masked by repressor interaction with domains distinct from that required for transcription regulation. *EMBO J.* 13:2192-2199

30. Kaplan, J. & Calame, K. (1997) The ZfN/POZ domain of ZF5 is required for both transcriptional activation and repression *Nucleic Acids Res.* 25(6):1108-1116
31. Katsani, K.R., Hajibagheri, M.A.N., Verrijzer, C.P. (1999) Co-operative DNA binding by GAGA transcription factor requires the conserved BTB/POZ domain and reorganizes promoter topology *EMBO J.* 18(3):698-708
32. Kerrigan, L.A., Croston G.E., Lira, L.M. & Kadonaga J.T. (1991) Sequence-specific transcriptional antirepression of the Drosophila Kruppel gene by the GAGA factor. *J. Biol. Chem.* 266(1):574-582
33. Komeili, A. & O'Shea, E.K. (1999) Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4 *Science* 284:977-980
34. Legrain, M., De Wilde, M. & Hilger, F. (1986) Isolation, physical characterization and expression analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* positive regulatory gene *PHO4*. *Nucleic Acids Res.* 14:3059-3073
35. Lenburg, M.E. & O'Shea, E.K. (1996) Signaling phosphate starvation. *Trends Biochem. Sci.* 21:383-387
36. Lewin, B. (1998) Molekularbiologie der Gene; aus dem Englischen übersetzt von Kurt Beinhorn *et al.*; Spektrum, akademischer Verlag
37. Lohr, D. (1997) Nucleosome Transactions on the Promoters of the Yeast *GAL* and *PHO* Genes. *J. Biol. Chem.* 272(43):26795-26798
38. Lu, Q., Wallrath, L.L., Granok, H. & Elgin, S.C. (1993) (CT)_n (GA)_n repeats and heat shock elements have distinct roles in chromatin structure and transcriptional activation of the Drosophila hsp26 gene *Mol. Cell. Biol.* 13(5):2802-2814
39. Madden, S.L., Creasy, C.L., Srinivas, V., Fawcett, W. & Bergman, L.W. (1988) Structure and expression of the PHO80 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 16(6):2625-2637
40. Magbanua, J.P., Ogawa, N., Harashima, S. & Oshima Y. (1997) The transcriptional activators of the PHO regulon, Pho4p and Pho2p, interact directly with each other and with components of the basal transcription machinery in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* 121(5):1182-1189
41. Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook J. (1982) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York

42. McAndrew, P.C., Svaren, J., Martin, S.R., Hörz, W. & Goding, C.R. (1998) Requirements for chromatin modulation and transcription activation by the Pho4 acidic activation domain *Mol. Cell. Biol.* 18(10):5818-5827
43. Ogawa, N. & Oshima, Y. (1990) Functional domains of a positive regulatory protein, PHO4, for transcriptional control of the phosphatase regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10:2224-2236
44. Okada, M. & Hirose, S. (1998) Chromatin remodeling mediated by Drosophila GAGA factor and ISWI activates fushi tarazu gene transcription in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 18(5):2455-2461
45. Pagans, S., Ortiz-Lombardía, M., Espinás, M.L., Bernués, J. & Azorín, F. (2002) The Drosophila transcription factor tramtrack (TTKD) interacts with Trithorax-like (GAGA) and represses GAGA-mediated activation *Nucleic Acids Res.* 30(20):4406-4413
46. Pedone, P.V., Ghirlando, R., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Felsenfeld, G. & Omichinski, J.G. (1996) The single Cys₂-His₂ zinc finger domain of the GAGA protein flanked by basic residues is sufficient for high-affinity specific DNA binding *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:2822-2826
47. Peterson, C.L. & Tamkun, J.W. (1995) The Swi-Snf complex: a chromatin remodeling machine? *Trends Biochem. Sci.* 20:143-146
48. Pile, L.A. & Cartwright (2000) GAGA factor-dependent transcription and establishment of DNase hypersensitivity are independent and unrelated events in vivo. *J. Biol. Chem.* 275(2):1398-1404
49. Regier, J.L., Shen, F., & Triezenberg, S. J. (1993) Pattern of aromatic and hydrophobic amino acids critical for one of two subdomains of the VP16 transcriptional activator. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:883–887
50. Reinke, H. & Hörz, W. (2003) Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated *PHO5* promoter *Mol. Cell* 11(6): im Druck
51. Sandaltzopoulos, R., Mitchelmore, C., Bonte, E., Wall, G. & Becker, P.B. (1995) Dual regulation of the Drosophila hsp26 promoter in vitro. *Nucleic Acids Res.* 23(13):2479-2487
52. Sarkar, G. & Sommer, S.S. (1990) The “Megaprimer” Method of site-directed Mutagenesis. *BioTechniques* 8(4):404-407

53. Schmid, A., Fascher, K.D. & Hörz, W. (1992) Nucleosome Disruption at the Yeast *PHO5* Promoter upon *PHO5* Induction Occurs in the Absence of DNA Replication. *Cell* 71:853-864
54. Schwendemann, A. & Lehmann, M. (2002) Pipsqueak and GAGA factor act in concert as partners at homeotic and many other loci *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99(20):12883-12888
55. Shao, D., Creasy, C.L. & Bergman, L.W. (1996) Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* Pho2 with Pho4 increases the accessibility of the activation domain. *Mol. Gen. Genet.* 25:358-364
56. Soeller, W.C., Euk Oh, C. & Kornberg, T.B. (1993) Isolation of cDNAs Encoding the Drosophila GAGA Transcription Factor. *Mol. Cell. Biol.* 13:7961-7970
57. Steger, D.J., Haswell, E.S., Miller, A.L., Went, S.R. & O'Shea, E.K. (2003) Regulation of chromatin remodelling by inositol polyphosphates *Science* 299:114-116
58. Straka, C. & Hörz, W. (1991) A functional role for nucleosomes in the repression of a yeast promoter. *EMBO J.* 10(2):361-368
59. Svaren, J. & Hörz, W. (1997) Transcription factors vs nucleosomes: regulation of the *PHO5* promoter in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 22:93-97
60. Svaren, J., Schmitz, J. & Hörz, W. (1994) The transactivation domain of Pho4 is required for nucleosome disruption at the *PHO5* promoter *EMBO J.* 13(20):4856-4862
61. Then Bergh, F., Flinn, E.M., Svaren, J., Wright, A.P. & Hörz, W. (2000) Comparison of Nucleosome remodeling by the yeast transcription factor Pho4 and the glucocorticoid receptor *J. Biol. Chem.* 275(12):9035-9042
62. Tsukiyama, T., Becker, P.B. & Wu, C. (1994) ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. *Nature* 367:525-532
63. Uesugi, M., Nyanguile, O., Lu, H., Levine, A.J. & Verdine, G.L. (1997) Induced alpha helix in the VP16 activation domain upon binding to a human TAF. *Science* 277:1310-1313
64. Vaquero, A., Espinás, L.M., Azorín, F. & Bernués J. (2000) Functional mapping of the GAGA factor assigns its transcriptional activity to the c-terminal glutamine-rich domain. *J. Biol. Chem.* 275(26):19461-19468

65. Venter, U., Svaren, J., Schmitz, J., Schmid, A. & Hörz, W. (1994) A nucleosome precludes binding of the transcription factor Pho4 in vivo to a critical target site in the *PHO5* promoter. *EMBO J.* 13(20):4848-4855
66. Vogel, K., Hörz, W. & Hinnen, A. (1989) The two positively acting regulatory proteins PHO2 and PHO4 physically interact with PHO5 upstream activation regions. *Mol. Cell. Biol.* 9(5):2050-2057
67. Vogelauer, M., Wu, J., Suka, N. & Grunstein, M. (2000) Global histone acetylation and deacetylation in yeast *Nature* 408:495-498
68. Wall, G., Varga-Weisz, P.D., Sandaltzopoulos, R. & Becker, P.B. (1995) Chromatin remodelling by GAGA factor and heat shock factor at the hypersensitive *Drosophila* hsp26 promoter in vitro. *EMBO J.* 14(8):1727-1736
69. Wilkins, R.C. & Lis, J.T. (1997) Dynamics of potentiation and activation: GAGA factor and its role in heat shock gene regulation. *Nucleic Acids Res* 25(20): 3963-3968
70. Wilkins, R.C. & Lis, J.T. (1999) DNA distortion and multimerization: novel functions of the glutamine-rich Domain of GAGA Factor *J. Mol. Biol.* 285:515-525
71. Wu, W.-H. & Hampsey, M. (1999) An activation-specific role for transcription factor TFIIB in vivo *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2764-2769

7. Abkürzungsverzeichnis

Adh	Alkoholdehydrogenase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre DNA
Ci	Curie (1 Ci, $3,7 \cdot 10^{10}$ Becquerel)
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMS	Dimethylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DnaseI	DesoxyribonukleaseI
DTT	Dithiothreitol
<i>E74</i>	early ecdysone inducible gene encoding transcription factor located at chromosome position 74
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
<i>eve</i>	<i>even-skipped</i>
<i>ftz</i>	<i>fushi tarazu</i>
GAF	GAGA-Faktor
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
hsp	heat shock protein
LB	Luria Bertani (Medium)
min	Minuten
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
OD	optische Dichte
ONPP	ortho-Nitro-Phenyl-Phosphat
PCR	polymerase chain reaction
PAA	Polyacrylamid
PEG	Polyethylenglykol
POZ-Domäne	Poxvirus- und Zinkfinger-Domäne

Psq	Pipsqueak Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
SAGA	Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBP	TATA bindendes Protein
TE	Tris-EDTA
TEB	Tris-EDTA-Borat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFIIB	Transkriptionsfaktor IIB
TFIIE	Transkriptionsfaktor IIE
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTK	tramtrack Protein
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
UAS	upstream activating sequence
<i>Ubx</i>	<i>Ultrabithorax</i>
YNB	Yeast Nitrogen Base
ZF5	Zinc finger protein 5

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Hörz für die Bereitstellung des Themas, stetige Förderung und Interesse am Fortgang der Arbeit.

Die Mitglieder der Arbeitsgruppe haben mir engagiert die praktischen Aspekte molekularbiologischen Arbeitens vermittelt und waren jederzeit für Fragen offen. Ihnen möchte ich herzlich Danken.

Lebenslauf

Zur Person	Roman Kischel geboren am 21.02.1973 in München Staatsangehörigkeit: deutsch Familienstand: ledig
1979-1983	Grundschule an der Max-Kolmsperger-Straße in München
1983-1992	Werner-von-Siemens-Gymnasium an der Quiddestraße in München; Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am 8. Juli 1992
1992-1994	Vorklinischer Abschnitt des Studiums der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München; Ärztliche Vorprüfung am 22. August 1994
1994-1999	Klinischer Abschnitt des Studiums der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München; Abschluß des Studiums mit dem dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 4. Mai 1999
1999-2000	Arzt im Praktikum am Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Approbation als Arzt am 01. Dezember 2000
Dezember 2000	Weiterbeschäftigung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
seit 2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im R&D-Bereich der Micromet AG in München
seit 1995	Promotion zum Dr. med. am Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München